

# TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 检测恙虫病东方体方法的建立

付秀萍, 贺金荣, 张景山, 王景泉

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所人兽共患病室, 北京 102206

**摘要:** **目的** 建立敏感、特异、定量 Real-time PCR 方法, 用于恙虫病东方体的检测。**方法** 根据恙虫病东方体 56 kD 外膜蛋白基因序列设计引物和探针, 建立实时荧光定量 PCR 检测方法。**结果** 建立的 TaqMan-MGB 探针具有良好的特异性, 建立的荧光定量 PCR 标准曲线的循环阈值(Ct)与模板拷贝数呈良好的线性关系( $r=0.99$ ), 灵敏性评估发现每个 20  $\mu$ l PCR 反应管中只要有 26 个拷贝的目的基因即可被检测到, 即最低检出浓度为 2 拷贝/ $\mu$ l, 并且具有较好的重复性。**结论** 建立的荧光定量 PCR 方法具有很高的特异性和敏感性, 可用于恙虫病东方体感染的快速检测。

**关键词:** 恙虫病东方体; 实时荧光定量 PCR; TaqMan-MGB 探针

中图分类号: R513.2 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2012)02-0108-03

## Establishment of Real-time PCR assays for detection of *Orientia tsutsugamushi* 56 kD gene with a TaqMan-MGB probe

FU Xiu-ping, HE Jin-rong, ZHANG Jing-shan, WANG Jing-quan

National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program)(No. 2010CB530200)

**Abstract: Objective** To develop a highly specific and sensitive Real-time PCR assay to detect *Orientia tsutsugamushi*.

**Methods** A pair of primers and a TaqMan-MGB probe were designed according to the 56 kD outer membrane gene sequence.

**Results** A linear relationship between the threshold cycle (Ct) of the quantitative Real-time PCR and the DNA copy number was demonstrated ( $r=0.99$ ). The standard curve showed that 26 copies target genes per reaction could be detected by this method. The lowest detection limit of this method was 2 copies per  $\mu$ l. The method showed high species specificity and good reproducibility. **Conclusion** These results suggested that the Real-time PCR with TaqMan-MGB assay is highly specific and sensitive for the detection of *O. tsutsugamushi*, which might be applied for the diagnosis of this infection.

**Key words:** *Orientia tsutsugamushi*; Real-time PCR; TaqMan-MGB probe

恙虫病又称丛林斑疹伤寒, 其病原体为恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*)。恙虫病是通过感染恙虫病东方体的恙螨叮咬而传播, 临床上以高热、淋巴结肿大、皮疹、焦痂为其主要特征。由于该病与其他一些发热性传染病的临床症状相似易引起误诊、治疗不当, 甚至发生死亡。因此, 建立快速、准确的诊断方法十分重要。

恙虫病的诊断主要包括 Giemsa 染色、病原分离、间接免疫荧光试验(IFA)、分子生物学等检测<sup>[1]</sup>。感染早期样本中恙虫病东方体含量少, 用 Giemsa 染色检测到恙虫病东方体非常困难。IFA 方法检测患者血清中恙虫病东方体特异性抗体, 但是特异性抗体出现较

晚, 难以用于恙虫病的早期诊断。近年来, 采用 PCR 以及巢式 PCR 检测恙虫病东方体 DNA 的方法用于恙虫病的早期诊断中<sup>[2-6]</sup>。荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术是目前国际公认的特异性、敏感性、重现性显著高于普通 PCR 的核酸检测方法, 已经开始用于多种病毒、细菌的检测<sup>[7]</sup>。

恙虫病东方体主要有 Karp、Kato、Gilliam、Boryong、Kawasaki 等抗原型。本研究根据上述主要的抗原型, 以及我国山西、内蒙古、台湾, 泰国、日本等地的菌株 56 kD 外膜蛋白基因序列设计引物和探针, 建立检测恙虫病东方体的 Real-time PCR 方法。

### 1 材料与方法

1.1 立克次体 DNA 恙虫病东方体 Kawasaki 株, 查菲埃立克次体基因组 DNA 为本室保存。恙虫病东方体

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助(2010CB530200)

作者简介: 付秀萍(1977-), 女, 硕士, 助理研究员, 从事立克次体疾病预防与控制研究。Email: fuxiuping313@sina.com

(Gilliam株、Karp株、Kato株、Boryon株)、贝氏柯克斯体、普氏立克次体基因组DNA,为美国得克萨斯大学惠赠。

1.2 其他细菌DNA 肺炎链球菌(31004)、嗜肺军团菌(12型)、炭疽(A16R)、鼠疫菌(EV76),均为中国疾病预防控制中心传染病预防控制所有科室提供。

1.3 主要仪器设备与试剂 罗氏(Roche LightCycle)荧光定量PCR仪,台式高速离心机Eppendorf centrifuge 5415D,核酸浓度测定仪NanoDrop-1000 Spectrophotometer, QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN),小量质粒提取试剂、核酸纯化试剂盒、pMD18-T Vector、JM109感受态细胞、Real-time PCR反应试剂Premix Ex Taq™,均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.4 引物设计 56 kD蛋白位于恙虫病东方体外膜,是一个型特异性抗原,是PCR检测最常用的扩增靶基因。目前GenBank上已发表的56 kD基因序列有Karp、Kato、Gilliam、Boryong、Kawasaki等主要的抗原型;另外还有我国山西、内蒙古、台湾等地以及泰国、日本等地的菌株56 kD序列。采用AB I primer Express 2.0软件设计探针和引物,引物和探针由上海基康生物公司合成。上游引物56 kD-RP:TTT YWG CTA GTG CRA TAG AAT TRG;下游引物56 kD-FP:CGC CAG TRA TMA TTC CTC CRA;TaqMan探针:FAM-TAA GGA CCA CAC TCT AAT C-MGB(碱基简并表:Y=C/T, W=A/T, R=A/G, M=A/C)。

1.5 标准品的制备 以56 kD-RP和56 kD-FP为引物,恙虫病东方体标准株Karp的DNA为模板,扩增目的基因片段,产物长度为126 bp。PCR产物切胶回收纯化,连接到T载体,导入JM109感受态细胞,筛选阳性克隆子,用PCR进行验证,测序进一步确定,提取质粒,-20℃保存。

1.6 质粒拷贝数浓度换算 测定质粒浓度为3.9 ng/μl,根据质粒的相对分子质量将质粒样品浓度换算为拷贝数浓度。拷贝数浓度(拷贝/ml)=(质量/相对分子质量)×6.02×10<sup>23</sup>,质粒的相对分子质量=660×(2692+126)=1 859 880,其中660是每个碱基的平均相对分子质量,2692为T载体的碱基数。通过计算得出拷贝数的浓度为1.26×10<sup>19</sup>拷贝/ml。

1.7 引物浓度和探针浓度优化 固定探针浓度在100 nmol/L,上下游引物反应浓度分别采用100、300、600、900 nmol/L,检测阳性对照DNA,根据扩增反应的循环阈值(Ct)和扩增曲线的荧光信号强度选择最优引物浓度。采用优化的引物浓度,探针终浓度分别采用100、200、300 nmol/L,检测阳性对照DNA,根据扩增反应的Ct和扩增曲线的荧光信号强度选择最优探针浓

度。相同的扩增体系均设2孔进行平行检测。

1.8 标准曲线的制备 将标准品10×倍比稀释后,使浓度达到1.26×10<sup>8</sup>~1.26×10<sup>2</sup>/ml进行Real-time PCR,同时做3个平行样品。

1.9 反应体系及反应参数 Real-time PCR反应体系: Premix (TaKaRa) Ex Taq™ (2×) 10 μl; PCR Forward Primer(10 μmol/L)0.4 μl; PCR Reverse Primer(10 μmol/L) 0.4 μl; TaqMan Probe (10 μmol/L) 0.2 μl; DNA模板 2.0 μl; 去离子水 7.0 μl,总体积 20 μl。反应条件采用两步法PCR扩增标准程序:第一步,预变性,95℃ 10 s, 1个循环;第二步,PCR反应95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 40个循环。

## 2 结果

2.1 最优引物探针浓度 当上下游引物浓度分别为300 nmol/L时,扩增Ct值较小,且荧光信号较强,故选择300 nmol/L为最佳上下游引物(图1)。当探针浓度为200 nmol/L时,扩增Ct值较小,故选择200 nmol/L为最佳探针浓度。

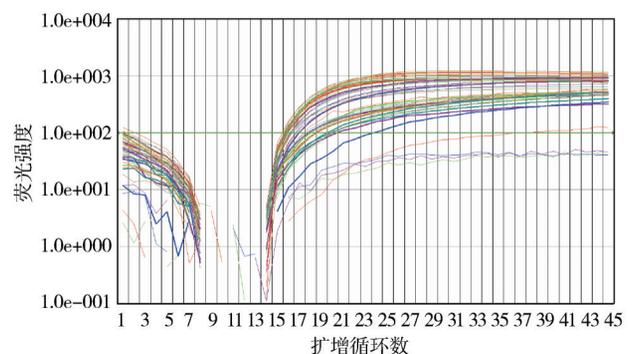


图1 不同引物浓度下RT-PCR扩增曲线

Fig. 1 Fluorescence curve with different concentrations of primers

2.2 敏感性分析 在质粒浓度为1.26×10<sup>2</sup>~1.26×10<sup>8</sup>/ml时,对应的Ct值显示检测下限为1.26×10<sup>4</sup>拷贝/ml。按每个PCR反应的DNA模板量为2 μl换算,每个反应管中的拷贝数为25.2个,即每个20 μl PCR反应管中只要有26个拷贝的目的基因即可被检测到,即最低检出浓度为2拷贝/μl。Real-time PCR结果显示,10×倍比稀释的标准品3次平行重复结果比较一致(图2)。且不同批次倍比稀释标准品重复结果也较一致。由质粒浓度对数值及其对应Ct值绘制的标准曲线的r绝对值为0.99,由直线斜率推出的扩增效率(E)约为0.90(E=10<sup>-1/斜率</sup>,斜率=3.281)(图3)。

2.3 引物及探针特异性分析 分别检测恙虫病东方体Gilliam株、Karp株、Kato株、Boryon株和Kawasaki株,查菲埃立克体、贝氏柯克斯体、普氏立克次体、肺炎链球菌、嗜肺军团菌、炭疽、鼠疫菌的DNA模板,结果显

示恙虫病东方体各种血清型的恙虫病东方体样品检测到很强的荧光信号,浓度相近时Ct值也相近。其余非恙虫病东方体样品检测结果均未见荧光信号(检测拷贝数为0),表明该方法具有恙虫病东方体种特异性(图4)。

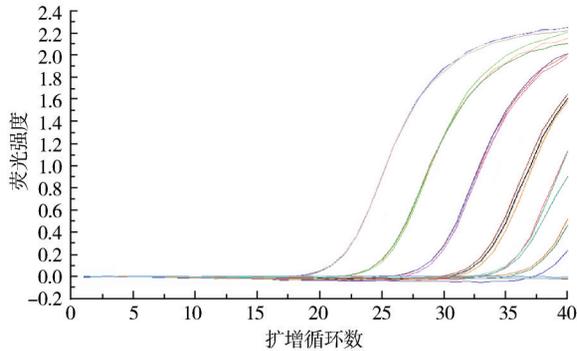


图2 标准品的扩增曲线

Fig. 2 Fluorescence curve of standard references

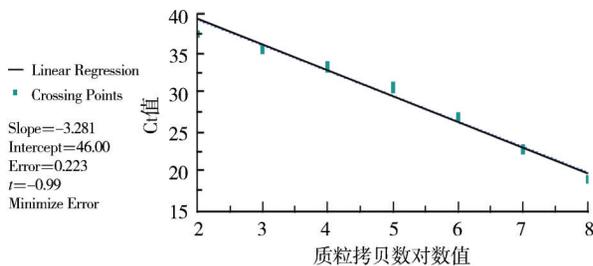


图3 质粒浓度对数值及其对应Ct值绘制的标准曲线

Fig. 3 The standard curve based on the log value of plasmid density and Ct values

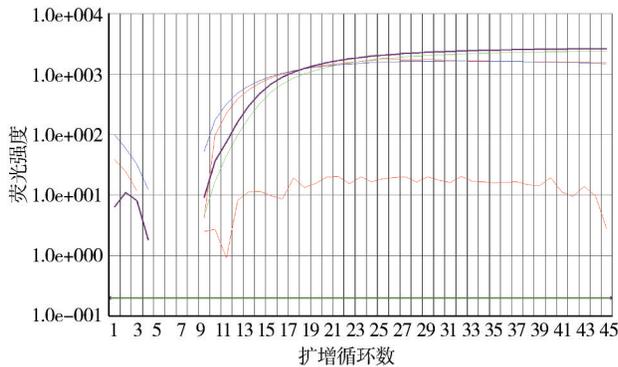


图4 不同DNA样品的扩增曲线

Fig. 4 Amplification curve of different samples

### 3 讨论

恙虫病东方体是一种专性细胞内寄生的微生物,不能在无生命的培养基中生长,必须通过细胞、鸡胚或

动物接种才能将其分离,因此恙虫病东方体分离困难,耗时耗力,需要有专业的技术人员操作,这些限制了一般临床实验室的恙虫病病原学诊断。

本研究依据恙虫病东方体56 kD外膜蛋白基因序列,设计引物与TaqMan探针,用克隆的56 kD外膜蛋白基因片段作模板,建立了检测恙虫病东方体的Real-time PCR方法。分析结果显示,该方法具有恙虫病东方体的种特异性,其检测的灵敏度可达到每个PCR反应管中只要有26个拷贝的目的基因即可被检测到,显示出很高的敏感性。倍比稀释的标准品3次平行重复结果比较一致,且不同批次倍比稀释标准品重复结果也较一致。说明该方法具有良好的重现性。根据Ct值的变异系数由质粒浓度对数值及其对应Ct值绘制的标准曲线的r绝对值为0.99,由直线斜率推出的扩增效率(E)约为0.90,可以认为系统误差较小,实验操作准确,结果可信。

本研究建立的Real-time PCR方法可为恙虫病早期的临床诊断提供一种有效的实验室检测。

### 参考文献

- [1] Manosroi J, Chutipongvivate S, Auwanit W, et al. Early diagnosis of scrub typhus in Thailand from clinical specimens by nested polymerase chain reaction [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2003, 34(4): 831.
- [2] Kodama K, Senba T, Yamauchi H, et al. Japanese spotted fever definitively diagnosed by the polymerase chain reaction method [J]. J Infect Chemother, 2002, 8(3): 266.
- [3] Zhang S, Song H, Liu Y. Scrub typhus in previously unrecognized areas of endemicity in China [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1241-1244.
- [4] 于昌军, 张守印, 李国兰, 等. 巢式PCR及序列分析用于恙虫病早期诊断的实验研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(11): 2524-2525.
- [5] 付秀萍, 张景山, 申晓靖, 等. 河南省信阳地区鼠类感染立克次体的调查 [J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(6): 547-549.
- [6] 付秀萍, 刘玉英, 张宝华, 等. 首次实验室证实北京平谷地区恙虫病东方体暴发流行 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2011, 22(2): 137-140.
- [7] Paris DH, Aukkanit N, Jenjaroen K, et al. A highly sensitive quantitative Real-time PCR assay based on the *groEL* gene of contemporary Thai strains of *Orientia tsutsugamushi* [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15: 488-495.

收稿日期: 2011-10-08