

· 实验研究 ·

复合探针荧光定量 PCR 法检测布鲁氏菌的实验研究 *

吴忠华 吕沁风 郑 伟 李 禾

(浙江国际旅行卫生保健中心 浙江 杭州 310003)

摘要 目的:建立用复合探针荧光定量 PCR 快速检测布鲁氏菌的方法。方法:研究根据 BSCP31 基因编码 31KDa 的布鲁氏杆菌表面蛋白的核苷酸序列设计特异引物,通过 PCR 法的特异性、灵敏度和重复性研究,建立了复合探针荧光定量 PCR 检测布鲁氏菌的方法,用于布鲁氏菌病的筛选和诊断。结果:结果表明该检测方法的特异性为 100%,最低可检出 10 个拷贝的质粒 DNA 分子,可对 1×10^1 - 1×10^6 拷贝范围内的模板进行定量,最低可检测至 1×10^2 CFU/ml 细菌。该方法的精密度好,阳性质控品和阴性质控品不同时间测定三次及同一时间五次重复实验结果 CV 值均小于 5%。结论:本研究建立的复合探针实时荧光定量 PCR 检测布鲁氏杆菌的方法,可对布鲁氏病原菌进行快速检测,对布病的筛选和确诊具有重要意义。

关键词: 复合探针; 荧光定量 PCR; 布鲁氏杆菌

中图分类号:R446, R378.5 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273 (2011) 21-4054-04

Experimental Research on Brucella Bacteria Detection by Fluorescent Quantitative PCR with Composite Probe*

WU Zhong-hua, LV Qin-feng, ZHENG Wei, LI He

(International Travel Healthcare Center, Zhejiang, Hangzhou 310003 China)

ABSTRACT Objective: To establish a composite probe fluorescent quantitative PCR assay for Brucella detection. **Methods:** BSCP31 gene nucleotide sequences specific for 31KDa surface protein of Brucella was used for the PCR primers design. According to the specificity, sensitivity and reproducibility of primers, a composite probe fluorescent quantitative PCR assay for Brucella detection was established for screening and diagnosis of Brucella disease. **Results:** The specificity of composite probe fluorescent quantitative PCR assay was 100%. The assay can detect the minimum 10 copies of plasmid DNA molecules. Accurate quantization can be achieved with template samples detected within 1×10^1 - 1×10^6 copies. The minimum bacteria concentration can be detected by the assay reaching 1×10^2 CFU / ml. The assay has good precision. The positive controls and negative control materials measured three times at different times or at the same time repeat the experiment five times, from which the CV values were calculated less than 5%. **Conclusion:** This study established the composite prober fluorescent quantitative PCR assay for Brucella detection, which can rapidly detect Brucella bacteria and has important meaning on screening and diagnosis of brucellosis.

Key words: Composite probe; Fluorescent quantitative PCR; Brucella bacteria

Chinese Library Classification(CLC): R446 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 21-4054-04

前言

布鲁氏菌病(布病)由布鲁氏菌引起的人畜共患自然疫源性传染病,它危害严重,流行广。布鲁氏菌可感染人类、多种家畜和野生动物,引起发热、流产与不育、慢性关节炎及神经损害,是一种重要的生物战剂和生物恐怖剂。多年来对布病诊断采用细菌学和血清学技术,前者费事费力,而且检出率低;后者虽然快速,但易造成较多的假阳性和假阴性^[1]。因此建立一种快速、准确的布鲁氏菌检测方法,对布病的诊断、治疗、预防以及最终控制布病均具有重要的意义。本研究根据 BSCP31 基因编码 31KDa 的布鲁氏杆菌表面蛋白的核苷酸序列设计了 1 对 PCR 特异引物,通过对影响 PCR 扩增条件的优化,建立了布

氏菌复合探针荧光定量 PCR 的检测方法,为快速筛查布鲁氏菌提供了简易、可行的方法,对布病的准确诊断及防控策略的制定有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试剂和菌种

美国 Transgenomic 公司荧光标记试剂套装;分析纯饱和氨水(上海分析试剂厂);丙腈,HPLC 级(美国 Sigma 公司);羊种布鲁氏菌 25840(ATCC),牛种布鲁氏菌 2308(中国兽医药品监察所),阴性特异性参考菌株 20 株(购置 ATCC 或 CMCC),其它 56 株非布鲁氏菌(浙江省疾病预防控制中心提供);DNA 测序试剂盒(Beckman 公司)。pGEM-T 载体试剂盒

* 基金项目:国家质量监督检验检疫总局科研基金(2007IK197)

作者简介:吴忠华,男,硕士,副主任技师,主要研究方向:分子生物学 电话:13757195558, Email:wzh@ziq.gov.cn

(收稿日期:2011-06-27 接受日期:2011-07-22)

(Promega 公司);质粒提取试剂盒(Promega 公司);PCR 产物回收试剂盒 (Promega 公司);10× PCR Buffer(100mmol/L TrisH-Cl,pH8.3, 500mmol/LKCl)自制。

1.2 实验仪器

美国 ABI 公司 PE3900 及 Expedite8909 全自动 DNA 合成仪;美国 Labconco TRIAD2.5I 冷冻干燥机;美国 Beckman 公司 DU640 紫外检测仪;美国 Bio-rad 公司 iCycler IQ 荧光定量 PCR 仪。

1.3 引物

根据 GenBank 中公布的布鲁氏菌 BSCP31 基因编码 31KDa 的基因序列(参考序列登录号为 GU317364)设计特异性引物如下:

上游引物的基因序列 BRF1 为:5'- CAAGGGCAAGGTG-GAAGATT -3';

下游引物的基因序列 BRR1 为:5' - CTGCGACC-GATTTGATGTTT -3'

荧光探针的基因序列 FPBR1 为:5'- FAM-ATCGTTTC-

CGGGTAAAGCGTCGCCA-P-3'

淬灭探针的基因序列 QPBR1 为:5'- CGCTTTACCCG-GAAACGA -DABCYL-3'

1.4 方法

1.4.1 核酸提取方法 取 50μl 1× 10⁹CFU/mL 的细菌参考品,置于沸水浴中煮沸 10 分钟,10000× g 离心 2 分钟,取 2μl 上清作为 PCR 模板。

1.4.2 PCR 反应体系 反应体系为 25μl:10mmol/L 的 Tris-HCl, pH 为 8.0;50mmol/L 的 KCl;体积百分比 3% 甲酰胺;5 mmol/L MgCl₂;100μmol/L 的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP;0.5 mol/L 的的上游引物,0.5 mol/L 的下游引物,1.5U Taq 酶,100nmol/L 的荧光探针,200nmol/L 的淬灭探针;PCR 反应程序为:预变性 95℃3min、94℃5s、扩增的退火温度为 54℃20s 共 40 个循环。

1.4.3 PCR 的特异性测定 用上述方法分析 2 株布鲁氏杆菌阳性特异性参考品(羊种布鲁氏菌和牛种布鲁氏菌)见表 1、20 株阴性特异性参考品和 56 株肠道菌株(浙江省疾病预防控制中心提供)。

表 1 阳性特异性菌株相关信息
Table 1 Information of specific positive strain

菌株编号 Strain number	浓度 Concentration (CFU/mL)	来源 Source
羊种布鲁氏菌 <i>Brucella melitensis</i> 25840	1 × 10 ⁶	ATCC*
牛种布鲁氏菌 <i>Brucella abortus</i> 2308	1 × 10 ⁶	中国兽药药品监察所 China Institute of Veterinary Drugs Control

1.4.4 PCR 的敏感性测定 取不同菌数的细菌参考品 (1× 10¹、1× 10²、1× 10³、1× 10⁴、1× 10⁵、1× 10⁶ CFU/ml) 各 50μl, 加入 50μlDNA 提取液,混匀后加热煮沸 10 分钟后,转入 40C 放置 10 分钟,然后离心取上清 2μl 作为模板,按上述优化后的方法进行荧光 PCR 检测。

1.4.5 PCR 的重复性测定 将强阳性质控品、临界阳性质控品和阴性质控品采用直接水煮法提取核酸,各取 2μl 用上述方法进行实时荧光 PCR 检测,批间重复测定 3 次,批内重复测定五次,计算批内及批间差异,评价该方法的精密度。

1.4.6 标准曲线制备 将克隆有目的基因片段的 PMD18-T 质粒作为标准品 DNA 模板,质粒标准品的灵敏度及线性分析:取不同 DNA 载量的质粒参考品 (1× 10⁰、1× 10¹、1× 10²、1× 10³、1× 10⁴、1× 10⁵、1× 10⁶) 各 2μl,进行荧光定量 PCR 检测。

1.4.7 模拟标本的测定 布鲁氏菌污染的血液模拟标本及阳性对照样本提取 DNA 作为模板,按上述荧光定量 PCR 的反应体系及反应程序在荧光定量 PCR 仪上进行扩增,反应体系及扩增条件与做标准曲线时一致。

2 结果

2.1 检测结果的特异性

用本法分析了 2 株布鲁氏杆菌阳性特异性参考品(羊种布鲁氏菌和牛种布鲁氏菌)、20 株阴性特异性参考品和 56 株肠道菌株。20 株阴性特异性参考品和 56 株肠道菌株检测结果均未阴性,2 株布鲁氏杆菌阳性特异性参考品检测结果为阳性,结果见表 2。从检测结果可知,该方法检测结果的特异性为 100%。

表 2 阳性特异性菌株检测结果
Table 2 Test result of specific positive strain

菌株名称 Strain name	检测结果 Test result	菌株名称 Strain name	检测结果 Test result
羊种布鲁氏菌 <i>Brucella melitensis</i> 25840	25.4	牛种布鲁氏菌 <i>Brucella abortus</i> 2308	19.6

2.2 检测结果的敏感性

检测结果从表 3 可知,最低可检测至 1× 10²CFU/ml 细菌。

2.3 检测结果的重复性

检测结果从表 4 可知,强阳性质控品、临界质控品和阴性质控品不同时间测定三次及同一时间五次重复实验,批内和批

间检测结果的 CV 值均小于 5%。

2.4 标准曲线

从表 5 和图 1 可知,将下述数据进行回归分析,得到 PCR 回归方程为:Y=-0.3572X+13.817,相关系数为 0.9928。实验结果表明,在 1× 10¹-1× 10⁶ 拷贝范围之间,样本拷贝数与其相应

的 CT 值具有良好的相关性,因此,本方法可对 1×10^1 - 1×10^6 质粒 DNA 分子。拷贝范围内的模板进行定量, 本方法最低可检出 10 个拷贝的

表 3 检测细菌的灵敏度
Table 3 The sensitivity of the method on bacteria detection

样本浓度 Sample concentration (CFU/ml)	Ct 值 Cut off value
1×10^6	25.473
1×10^5	29.429
1×10^4	31.630
1×10^3	34.530
1×10^2	38.279
1×10^1	0.000

表 4 检测质控品的重复性
Table 4 The repeatability of the method on quality control materials detection

样本	Ct 值 1 Cutoff value 1	Ct 值 2 Cutoff value 2	Ct 值 3 Cut off value 3	Ct 值 4 Cutoff value 4	Ct 值 5 Cut off value 5	Ct 值平均值 Average cut off value	SD	批内 Cv% Intra- assay Cv%	批间 Cv% inter- assay Cv%
强阳性质控品 Strong positive control	21.9	21.1	21.9	21.4	21.2	21.5	0.38	1.8	1.7
	21.8	21.3	22.0	21.8	21.1	21.6	0.38	1.8	
	21.5	21.6	22.1	22.2	21.7	21.8	0.31	1.4	
临界阳性质控品 Critical Positive control	33.1	32.9	33.3	33.5	33.9	33.3	0.38	1.1	1.3
	33.9	33.4	33.0	33.2	332.4	33.2	0.55	1.6	
	33.8	33.0	33.7	33.5	33.1	32.4	0.36	1.1	
阴性质控品 Negative control	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 5 检测质粒 DNA 的灵敏度分析
Table 5 The sensitivity of the method on plasmid DNA detection

样本拷贝数 Sample copy quantity	Ct 值 Cut off value
1×10^6	21.482
1×10^5	24.781
1×10^4	27.698
1×10^3	30.838
1×10^2	33.250
1×10^1	35.227
1×10^0	0.000

2.5 模拟标本检测

从表 6 的检测结果可知,在模拟污染的血液样品中,最低可检出 1×10^3 CFU/ml 细菌。

3 讨论

目前诊断布病主要采用血清学和细菌学方法。血清学方法种类繁多,但总的来说还没有任何一种方法在特异性、敏感性

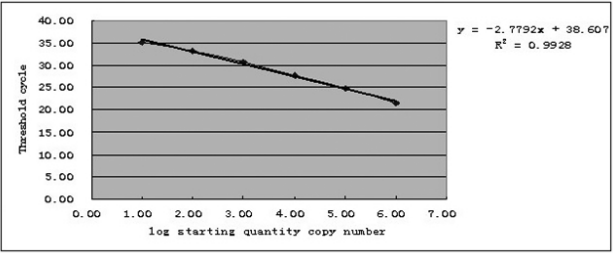


图 1 荧光定量 PCR 标准曲线
Fig 1 Calibration curve of fluorescent quantitative PCR

及可操作性等方面均令人满意, 细菌培养虽可直接查到病原体,但由于布鲁氏菌分离培养条件要求苛刻,阳性率很低,且分离过程中,存在操作人员面临被布鲁氏菌感染的危险及病菌从实验室扩散的风险^[2]。近年来,伴随着分子生物学技术的飞速发展,快速特异、灵敏度高、操作简便的聚合酶链反应技术已被引入到细菌性传染病的流行病学调查及诊断中,并初步显示了其应用前景^[3-5]。国内外学者在利用 PCR 技术检测布鲁氏菌方面做了较多的研究工作^[6-9],其中 Bailey GG 等按牛种布鲁氏菌

表 6 模拟污染血液样品的检测结果
Table 6 Test results of contaminated blood simulated samples

接种细菌浓度 Concentration of inoculated		Ct 值 Cut off value	
bacteria			
CFU/ml			
	纯菌 Pure strains		血液 Blood
1× 106	22.3		23.5
1× 105	26.4		28.7
1× 104	30.5		31.2
1× 103	34.3		34.9
1× 102	37.2		ND
1× 101	ND		ND

31KDa 外膜蛋白基因的核苷酸序列设计了 5 个引物 B1~B5, 将引物按不同组合做扩增试验,结果显示 B4 和 B5 配对最好^[10]。Ohtsuki R 等根据流产布鲁氏菌 BCSP31 株的基因序列设计两组用于 6 个种布鲁氏菌鉴别的环介导等温扩增(LAMP)的特异性引物,通过对 6 个种 22 株布鲁氏菌和 18 个种 28 株非布鲁氏菌的检测表明,对布鲁氏菌的检测具有特异性(35min, 63℃)和敏感性(10fg 基因组 DNA)^[11]。李坚等根据布鲁氏菌编码 312 kDa 布鲁氏菌蛋白的基因(BSCP31)和 IS711 插入序列及相邻单染色体 DNA 种的不同,设计引物,建立 AMOS-PCR 方法,用于诊断布鲁氏菌病,并鉴定种^[12]。用布鲁氏菌蛋白的基因(BSCP31)为引物可以扩增出牛、羊、猪型布鲁氏菌,用 IS711 插入序列及相邻单染色体设计的引物可以区别不同型别的布鲁氏菌,最低可检测到 1 Pg 的布鲁氏菌 DNA。

实时荧光定量 PCR 技术解决了传统 PCR 技术的不足,已经成为细菌、病毒等微生物快速定量检测的首选技术。目前,基于 FRET 的荧光定量 PCR 技术主要有 4 种,TaqMan、Amplisensor、Molecular beacon 及 Light-Cycler 荧光定量 PCR 技术,上述实时 PCR 技术均存在一些局限性,如淬灭不彻底、合成和标记复杂、非特异扩增不易区分等,但用复合探针实时荧光定量 PCR 技术,可以克服上述不足^[13-15]。本研究是针对布鲁氏杆菌 BSCP31 基因的标识序列设计一组特异引物,用本法分析了 2 株布鲁氏杆菌阳性特异性参考品(羊种布鲁氏菌和牛种布鲁氏菌)和 20 株阴性特异性参考品及浙江省疾病预防控制中心提供的 56 株其它肠道致病菌。从实验检测结果可知,检测结果全部阴性菌株均阴性,而阳性对照及阳性菌株结果为阳性。结果表明,本检测方法的特异性为 100%,具有很好的检测特异性。通过灵敏度试验本方法可检出 10 个拷贝的质粒 DNA 分子,可对 1× 10¹-1× 10⁶ 拷贝范围内的模板进行定量,最低可检测至 1× 10²CFU/ml 细菌。通过重复性试验该方法的精密度很好,阳性质控品和阴性质控品不同时间测定三次及同一时间五次重复实验结果 CV 值均小于 5%。

本研究建立了复合探针实时荧光定量 PCR 检测布鲁氏杆菌的方法,该方法灵敏度高、特异性强和重复性好,可对布鲁氏病原菌进行快速检测、准确辨别和早期诊断,对布病的筛选和确诊具有重要意义。

参 考 文 献(References)

[1] 姜凤华,于刚.布鲁氏菌 PCR 快速检测方法的建立[J].现代畜牧兽医,2008(2):4-5
Jiang Fen-hua, Yu Gang. The study on the method of the Brucella with PCR rapid detection [J]. Modern JOurnal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,2008(2):4-5

[2] 李坚,李铁峰,王艾琳.用 PCR 法对布鲁氏菌进行筛查及分型鉴定的研究[J].中国地方病防治杂志,2009,24(4):300-302
Li Jian, Li Tie-feng, Wang Ai-li. Study on the screening and species identification of Brucellahe with PCR assay. Chin J Ctrl Endem Dis 2009,24(4):300-302

[3] 高明华,张志炎,李跃等.布鲁氏菌病实验室诊断研究进展[J].中国人兽共患病学报.,2010,26(1):81-83
Gao Ming-hua, Zhang Zhi-yan, Li Yue et al. Progress in the study for f laboratory diagnosis of brucellosis[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2010,26(1):81-83

[4] 陈泽祥,许力干,榻雄标,杨威等.布鲁氏菌病原快速检测方法的建立[J].广西农业科学,2009,40(7):915-918
Chen Ze-xiang, Xu Li-gan, Xuan Xiong-biao, et al. A rapid detection method for pathogen of brucellosi[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2009,40(7):915-918

[5] Adone R, Francia M, Ciuchini F. Brucella melitensis B115 based complement fixation test to detect antibodies induced by Brucellarough strains[J]. J Appl M icrobiol, 2008, 105(2): 567-572

[6] Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, et al. Evaluation of the Brucella abortus species-specific polym erase chain reaction assay, an improved version of the Brucella AM OS polymerase chain reaction assay for cattle[J]. J Vet Diagn Invest, 2003, 15 (4):374-378

[7] W hatmore AM, Murphy TJ, Shankster SJ, et al. Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type Brucella isolates of medical and veterinary interest [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2): 761-769

[8] Vladyslava GR, David MS, Sheela R, et al. Molecular targets for rapid identification of brucella spp[J]. BMC Microbiol, 2006, 6(1):13-32

[9] Lopez GI, Garcia YD, Marin CM, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay(Bruce-ladder)for molecular typing of all Brucella species, including the vaccine strains [J].J Clin Microbiol, 2008, 46 (10): 3484-3487

(下转第 4068 页)

- nicardipine in treating hypertensive emergencies [J]. Chinese Journal of Drugs and Clinical Remedies, 2005,24(10):795-797
- [13] 王浩. 乌拉地尔治疗高血压急症的临床分析 [J]. 医师进修杂志, 2003,26(5):38-39.
- Wang Hao. Clinical analysis on hypertensive emergencies treated with urapidil [J]. Postgraduates of Medicine, 2003,26(5):38-39
- [14] Kozakova M, Marco J, Heusch G, et al. The alpha1-adrenergic blocker urapidil improves contractile function in patients 3 months after coronary stenting:a randomized,double-blinded study [J].Am Heart J, 2004,147(2): 6
- [15] Yang HJ, Kim JG, Lim YS, et al. Nicardipine versus nitroprusside infusion as antihypertensive therapy in hypertensive emergencies [J]. J Int Med Res,2004,32(2):118-123
- [16] Liu-Deryke X,Janisse J,Coplin WM, et al. A comparison of nicardipine and labetalol for acute hypertension management following stroke [J]. Neurocrit Care, 2008,9(2):167-176
- [17] Alijotas-Reig J, Bove-Farre I, de Cabo-Frances F, et al. Effectiveness and safety of prehospital urapidil for hypertensive emergencies [J]. Am J Emerg Med,2001,19(2):130-133
- [18] Curran MP, Robinson DM, Keating GM. Intravenous nicardipine: its use in the short term treatment of hypertension and various other indications[J]. Drug, 2006,66(13):1755-1782
- [19] Wallin JD, Fletcher E, Ram CV, et al. Intravenous nicardipine for the treatment of sever hypertension [J]. Arch Intern Med,1989 ,149(12): 2662-2669
- [20] 杨志雄,余东平,杨仕光.尼卡地平 and 乌拉地尔对高血压脑出血术后的疗效比较[J].中国实用神经疾病杂志, 2010,13(5):7-8
- Yang Zhixiong, Yu Dongping, Yang Shiguang.Comparison of nicardipine and urapidil for hypertensive cerebral hemorrhage [J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2010, 13 (5):7-8
-
- (上接第 4057 页)
- [10] Bailey GG, Krahn JB, Drasar BS, et al. Detection of Bmcella Melitensis and Brucella abortus by DNA plification [J]. J Trop Med Hyg,1992,95:271-275
- [11] Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, et al. Rapid detection of Brucella spp. by the loop-mediated isothermal amplification method (J3[J].J Appl Microbiol,2008,104(6): 1815-1823
- [12] 李坚,李铁锋,王艾琳. 用 PCR 法对布鲁氏菌进行筛查及分型鉴定的研究[J].中国地方病防治杂志,2009, 24(4):300-302
- Li Jian, Li Tie-feng, Wang Ai-lin. Study on the screening and species identification of Brucellahe with PCR assay [J]. Chin J Ctrl Endem Dis,2009,24(4):300-302
- [13] 陈苏红,王小红,张敏丽等.复合探针荧光定量 PCR 方法的建立[J].生物技术通讯,2003, 14(2):127-130.
- Chen Su-hong, Wang Xiao-hong, Zhang Min-li, et al. Fluorescent quantitative PCR vith complex probe technique[J]. Letters In Biotechnology,2003,14(2):127-130
- [14] Marell M, Gomez J, Esteban JI, et al. High-throughput realtime reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(2):327-335
- [15] Sagner G, Goldstein C, Mihenburg RV. Detection of multiple reporter dyes in real-time, on-line PCR analysis with the Light-Cycler system [J]. Roche Molecular Biochemicals 1999, 2:7-12