

• 临床检验研究论著 •

实时荧光定量 PCR 技术的优化及其在恙虫病东方体诊断中的应用*

何凤屏¹, 徐新¹, 王江桥², 柯昌文³, 罗君¹, 唐建红⁴, 周海燕⁵, 王箭¹, 周建英¹, 管振祺¹, 刘玉兰¹, 郑礼杰¹

(1. 广东省韶关市粤北人民医院检验科 512026; 2. 韶关学院医学院, 广东韶关 512026; 3. 广东省疾病预防控制中心, 广州 510300; 4. 广东省韶关市疾病预防控制中心 512028; 5. 广东省韶关市职业病防治院 512028)

摘要:目的 建立一种优化的实时荧光定量 PCR 技术, 并用于诊断粤北山区恙虫病东方体(Ot)基因型。方法 采用优化实时荧光定量 PCR 技术对感染 Ot 的患者和鼠类的血液和组织标本检测 Ot DNA 载量并分析其基因型, 并与未优化实时荧光定量 PCR 和巢式 PCR 的检测结果进行比较。结果 采用优化实时荧光定量 PCR 技术检测 660 例发热患者, 有 224 例检测到 Ot, 其中 108 例是发热 5 d 内的早期患恙虫病患者, 以及在 55 份鼠类的标本中有 12 份能检测到感染 Ot, 均为 Gilliam 型; 未优化实时荧光定量 PCR 在患病 7 d 以上才能检测到 Ot。同时, 在鼠类基因扩增片段还显示出与 Gilliam、Karp、Kato 3 株国际参考株不同, 经巢式 PCR 分型证实为 Kawasaki 型, 与巢式 PCR 基因分型的结果相符。结论 优化实时荧光定量 PCR 技术可作为早期诊断恙虫病的实验方法, 用于快速分析 Ot 基因型, 适合在基层医院推广应用。

关键词:恙虫病东方体; 聚合酶链反应; 基因分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)12-1422-03

Application of optimized real-time fluorescent quantitation PCR for the early diagnosis of Orientia tsutsugamushi*

He Fengping¹, Xu Xin¹, Wang Jiangqiao², Ke Changwen³, Luo Jun¹, Tang Jianhong⁴,

Zhou Haiyan⁵, Wang Jian¹, Zhou Jianying¹, Guan Zhenqi¹, Liu Yulan¹, Zheng Lijie¹

(1. Clinical Laboratory Department of Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512026, China; 2. Medical College of Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512026; 3. Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong 510300, China; 4. Center of Disease Control and Prevention of Shaoguan City, Shaoguan, Guangdong 512028, China; 5. Prevention and Treatment Hospital for Occupational Diseases of Shaoguan City, Shaoguan, Guangdong 512028, China)

Abstract: Objective To construct an optimized real-time fluorescent quantitation polymerase chain reaction (qPCR) assay for the detection of Orientia tsutsugamushi(Ot). **Methods** DNA concentration and genotype of Ot were detected by optimized real-time qPCR assay in blood and tissue samples from patients and mice with infection of Ot, and the detection results were compared with that detected by un-optimized real-time qPCR and nest PCR(nPCR). **Results** 660 patients with fever were detected by real-time qPCR, and 224 cases were confirmed to be with infection of Ot, including 108 patients were at early stage of akamushi disease and with fever less than 5 days, and in 55 samples from mice, 12 cases were positive with Ot for Gilliam strains. Ot could be detected by un-optimized real-time qPCR in patients with fever for at least 7 days, and samples from mice could be detected with gene fragment different from reference strains of Gilliam, Karp and Kato, which could be confirmed to be Kawasaki type by nPCR, identical to that acquired by nPCR. **Conclusion** Optimized real-time qPCR assay could be a rapid, simple and accurate method for diagnosis of patients with akamushi disease.

Key words: Orientia tsutsugamushi; polymerase chain reaction; genotyping

近年来,应用分子生物学技术研究恙虫病东方体(Ot)在国内外虽然已有一些报道^[1-2],但是各地区的地理环境、流行特点以及 Ot 基因型变异形成了各地区恙虫病的流行特征。由于目前缺乏敏感性高的恙虫病早期诊断的实验方法,故造成了恙病患者不能早期诊断和及时治疗。对粤北山区恙虫病的研究在中国未见有报道。因此,本研究采用优化实时荧光定量 PCR 技术,根据 Gilliam 型基因序列设计特异性引物和水解探针,建立了一种早期诊断恙虫病的实验方法,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 参考株 Gilliam、Karp、Kato 3 株国际参考株由广东省疾病预防控制中心提供。

1.1.2 分离株 224 株感染 Ot 的全血标本是从 660 份发热

患者中筛选的,均来自粤北山区 5 个调查点,其中有 108 份是发热 5 d 内的早期恙病患者标本;23 株是感染 Ot 黄毛鼠的脾组织标本,22 株是感染 Ot 的褐家鼠的脾组织标本。2 株地理纤恙螨匀浆标本。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取 采用 QIAamp DNA MinKit 试剂盒对以上标本提取 DNA,试剂盒由上海复星公司提供;回收试剂盒购自上海生工生物公司;荧光定量 PCR 试剂盒由上海复星公司提供;基因测序由上海 Invitrogen 生物技术有限公司完成。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测

4.1 Ot 探针、引物及扩增片段 在 TaqMan 探针基础上优化设计为 TaqMan-MGB 探针(minor groove binder oligodexynucleotide conjugate, MGB-ODN)。参照文献[3-4]Sta56 基因引

* 基金项目:韶关市科技项目资助项目(韶财教[2008]45 号)。

物设计的方法并进行改良和优化。引物 1 和引物 2 为外引物；引物 3 和引物 4 为群引物。引物 1: 5'-TAC ATT AGC TGC GGG TAT CAC-3'; 引物 2: 5'-CCA GCA TAA TTC TTC AAC CAA-3'; 引物 3: 5'-GAG CAG AGC TAG GTA TGT CGC-3'; 引物 4: 5'-TAG GCA TTA TAG TAG GCT GAC-3'; Gilliam 型引物: 5'-TAC ATT AGC TAG GTA TGT CGC-3'; Karp 型引物: 5'-GAT CAA GCT TCG TCC AGT CGC-3'; Kato 型引物: 5'-ATA ACA TCG GAT TAT CGT CGC-3'; Kawasaki 型引物: 5'-CTA GGG ATC CCG TAG GCT GAC-3'。Gilliam 株的扩增片段为: 5'-AGA TGA AAG GAT ATT AAA GGG CAT ACA GGC ATG GTT GCA TCA GGA GCA CTT GGT GTA GCA ATT AAT GCT GCT GAG GGT GTA T-3'。Kawasaki 型扩增片段为: 5'-CTA GGG ATC CCG ACA GAT GCA CTA TTA GGC ATG CTG CTA TTG ATA CAG GTC GAT CAA GCT TCC GGT-3'。

1.2.3 建立标准 DNA 模板 用引物扩增恙虫病东方体(Gilliam 株) 56×10^3 外膜蛋白基因片段, 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化该片段, 将该片段与 T 载体连接, 构建 56×10^3 外膜蛋白基因重组质粒, 将该质粒作为标准 DNA 模板。将模板做倍比稀释作为荧光定量 PCR 模板, 用于建立标准曲线。

1.2.4 核酸提取 患者外周血核酸(DNA)提取采用 QIAamp DNA MinKit 试剂盒提取 DNA 作模板, 采用荧光定量 PCR 检测 DNA 样本。鼠 DNA 提取: 取鼠脾标本约 0.3 g 于 Eppendorf 管内, 剪碎后加 800 μ L TE 缓冲液, 离心后取沉淀; 加 600 μ L 裂解缓冲液、15 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL)、25 μ L 溶菌酶(4 mg/mL) 55 $^{\circ}$ C 过夜; 用试剂盒从鼠脾样本中提取 DNA 作模板, 采用已优化的荧光定量 PCR 检测 DNA 样本。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 反应 每个反应体系中含 12.5 μ L TaqMan Universal PCR Master Mix, 5 μ L 外引物和探针混合物[100 μ L 体系中含上下游引物各 3 μ L(50 μ mol), 探针 2 μ L(50 μ mol), 92 μ L 去离子水], 5.5 μ L 去离子水, 2 μ L DNA 模板, 反应体系为 25 μ L。扩增条件: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min 循环 45 次。PCR 扩增产物纯化: 采用琼脂糖凝胶回收试剂盒, 从凝胶中回收 PCR 产物并进行测序。

1.2.6 PCR 分型 首先采用实时荧光定量 PCR 检测 Ot 基因型, 再用巢式 PCR(nPCR) 鉴定其 Ot 基因型。采用特异性群引物, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 按 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 2 min, 70 $^{\circ}$ C 2 min 扩增 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。以纯化的 PCR 阳性产物 1 μ L 为模板 DNA, 分别加入各型引物对 2 μ L。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯下观察结果。

1.2.7 核酸序列分析 根据以上 PCR 分型结果, 从中选出 4 个代表株: 2 个是从患者全血分离, 1 个是从黄毛鼠脾脏分离, 1 个是从乐昌纤恙螨分离。将其第 1 次 PCR 扩增产物纯化后作为序列测定模板, 以 PCR 群引物作为序列测定引物, 进行序列测定。

1.2.8 间接免疫荧光试验(IFA) 采用 IFA 检测 660 例发热患者的血清抗 Ot 抗体和 55 只鼠类的脾组织的抗 Ot 抗体, 严格按照说明书进行操作。

2 结 果

2.1 采用荧光定量 PCR 检测 Ot 的结果

2.1.1 敏感性分析 稀释的 Ot(Gilliam 株) 标准 DNA (5 copy/ μ L~ 0.5×10^7 copy/ μ L), 将其分别加到反应体系中进行荧光定量 PCR 反应。所建立的标准曲线表明, 该方法能

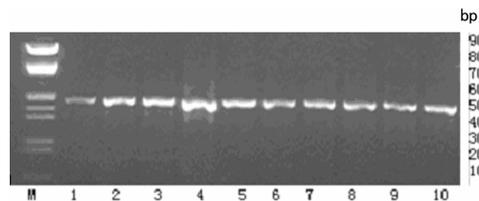
检测发热 3 d 内的早期 Ot 感染者, 最低检测限为 5 copy/ μ L, 最高检测限为 1.5×10^5 copy/ μ L。

2.1.2 特异性分析 采用优化荧光定量 PCR 技术分别在 224 份血液标本检测到 Ot DNA 载量为 13~20 745 copy/ μ L, 在 12 份感染 Ot 鼠类的脾脏组织和 2 份地理纤恙螨标本检测到 Ot DNA 载量为 14 459~87 016 copy/ μ L。

2.1.3 重复性分析 批内变异系数(CV)为 0.05%~1.6%, 批间 CV 为 1.4%~3.1%, 表明所建立的检测方法重复性好。

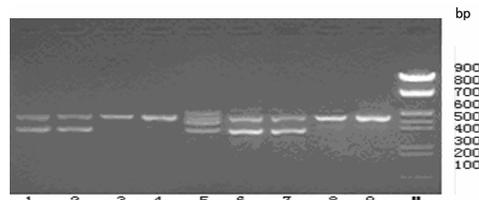
2.1.4 不同感染时相 Ot DNA 载量的检测 采用优化荧光定量 PCR 技术分别在 5、15、25 d 内检测感染 Ot 患者和鼠类的 Ot DNA 载量, 感染第 5 天患者和鼠类的 Ot DNA 平均载量分别为 220 copy/ μ L 和 290 copy/ μ L, 在感染第 15 天分别为 480 copy/ μ L 和 730 copy/ μ L, 在感染第 25 天分别为 800 copy/ μ L 和 980 copy/ μ L。优化实时荧光定量 PCR 技术能检测发热 3 d 的早期感染 Ot 患者, 最低能检测到 5 copy/ μ L 的模板 DNA, 感染 Ot 的高峰期是在第 7~15 天; 未优化实时荧光定量 PCR 在患病 7 d 以上才能检测到感染 Ot, 最低能检测到 48 copy/ μ L 的模板 DNA, 感染 Ot 的高峰期是在第 15~25 天。

2.2 PCR 扩增结果 3 株国际参考株和 4 株代表株分离到的 Ot DNA 用群引物扩增均出现相应的片段, 见图 1。在 224 份患者阳性标本中随机选取 2 份血标本作为粤北代表株, 命名为 YB-1、YB-2; 在 10 只感染 Ot 黄毛鼠和 2 只 Ot 家鼠中随机选取 2 份鼠脾脏组织和 1 份地里纤恙螨标本作为粤北代表株, 分别命名为 YB-3、YB-3'、YB-4。Ot DNA 用型引物扩增均出现相应片段, 见图 2, 4 份代表株 YB-1、YB-2、YB-3、YB-4 为 Kawasaki 型, 代表株 YB-3' 为 TA686 型。



M: DNA 标记物; 1: Gilliam 型; 2: Katp 型; 3: Kato 型; 4: YB-1; 5: YB-2; 6: YB-3; 7: YB-3'; 8: YB-3''; 9: YB-4; 10: YB-4'。

图 1 Ot 群特异性引物 PCR 扩增的电泳结果



M: DNA 标记物; 1: YB-1; 2: YB-2; 3: Kato 型; 4: Karp 型; 5: YB-3'; 6: YB-3; 7: YB-4; 8: Gilliam 型; 9: Gilliam 型。

图 2 Ot 型特异性引物 PCR 扩增的电泳结果

2.3 Ot 基因同源性分析 4 株代表株 Ot 测序结果表明分离株同源性为 100%, 与 Kawasaki 型的同源性为 96.25%, 与日本的 Kawasaki 型在同一分支有很近的亲缘关系。部分阳性鼠标本的核苷酸序列与 TA686 型的同源性为 78.5%, 与泰国的 TA686 型在同一分支亲缘关系也很近。

2.4 免疫荧光抗体检测结果 在 224 例感染 Ot 患者中有 116 例显示为抗体阳性, 阳性率为 51.79%, 在 108 例早期感染 Ot 的患者中显示为阴性结果。116 例抗体阳性患者的血清型

结果显示为 Gilliam 型,未见 Karp 和 Kat 型。

3 讨 论

实时荧光定量 PCR 是近年发展的一种定量检测基因变异的新技术,其应用于恙虫病的诊断已有报道^[5]。但是,笔者在实验中发现未优化的实时荧光定量 PCR 不能检测 Ot 的早期感染者,主要原因可能与形成引物二聚体有关。引物二聚体是非特异性退火和延伸的产物,它的形成会影响扩增的效率,降低实验的敏感性。因此,笔者对实时荧光定量 PCR 进行实验条件的优化^[6-8]:(1)设计为 TaqMan-MGB 探针,提高荧光定量 PCR 的专一性,进行特异性扩增,有效提高检测 Ot DNA 浓度的专一性和敏感性,能检测发热 3 d 内的早期 Ot 感染。(2)进行特异性引物设计及优化,当基因和引物二聚体的溶解温度确定后,在引物二聚体的溶解温度上进行“温度描绘”,维持 15 s 高温度的扩增,可避免非特异产物的形成。同时,设计 2 条引物在 3' 端不能互补,使 2 条引物的 GC 含量一致,减少引物二聚体的形成,提高实验的特异性和灵敏性。有研究者采用 Sta56 基因序列设计特异性引物的实时荧光定量 PCR 检测可疑血标本,达到 73% 的阳性率^[3-4]。本研究建立的优化实时荧光定量 PCR 用于检测粤北地区 660 份发热患者(体温为 38.5℃ 以上)的血标本,其中 224 份检测到 Ot DNA,阳性率达 33.94%,其中包括 108 例发热 5 d 内的早期 Ot 感染者。采用未优化实时荧光定量 PCR 技术只能检测感染 Ot 7 d 以上的人群;采用同样的方法在 55 份鼠类的标本中有 10 份黄毛鼠检测到 Ot,阳性率为 18.18%,有 2 份褐家鼠检测 Ot,阳性率为 3.64%,各调查点之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。荧光定量 PCR 和 IFA 检测结果为恙虫病 Gilliam 型。同时在鼠类基因扩增片段还显示出与 Gilliam、Karp、Kato 3 株国际参考株不同,经 nPCR 分型证实为 Kawasaki 型。可见粤北山区感染人和黄毛鼠的 Ot 至少存在 2 个以上的基因型,即 Gilliam 型、Kawasaki 型相似株,而 TA 686 型的相似株还有待于今后扩大样本进一步研究证实。本研究通过对粤北地区 Ot 基因序列同源性分析,发现感染人和鼠类的 Ot 的核苷酸序列同源性为 100%,与 Kawasaki 型的相似性为 96.25%,提示与日本的 Kawasaki 型在同一分支有很近的亲缘关系。部分鼠类感染 Ot 与 TA686 型的相似性为 78.5%,显示与泰国的 TA686 型在同一分支亲缘关系也很近。

国内学者朱丽娜等^[9]研究结果显示,实时荧光定量 PCR 具有 Ot 种的特异性,其检测灵敏度约为 nPCR 的 100 倍,敏感性较高,重复性好。本文研究结果显示其批内 CV 为 0.05%~1.6%,批间 CV 为 1.4%~3.1%,表明优化实时荧光定量 PCR 具有良好的重复性。采用优化和未优化的两种实时荧光定量 PCR 方法检测不同感染时相 Ot DNA 载量,提示优化实时荧光定量 PCR 技术在患病的第 3 天能检测到 Ot,最低能检测到 5 copy/ μ L 的模板 DNA,而未优化实时荧光定量 PCR 在患恙虫病的第 7 天以后检测到 Ot DNA,最低只能检测到 48 copy/ μ L 的模板 DNA,显示优化实时荧光定量 PCR 的灵敏性高于未优化的方法($P < 0.05$)。

Paris 等^[10]在 2009 年以 groEL 基因序列为检测目标构建了高度敏感的实时荧光定量 PCR。2009 年 Sonthayanon 等^[11]应用实时荧光定量 PCR 检测了 Ot 的 16S rRNA 基因在血中的量,结果表明该基因的含量与病情严重程度呈正相关。笔者采用优化实时荧光定量 PCR 技术检测不同感染时相的患者和

鼠类标本,分别在 5、15、25 d 内检测到 Ot DNA,其载量与患病的严重程度有关联。因此,该技术可作为早期检测 Ot 的实验室诊断方法。

本研究采用 IFA 检测 224 例感染 Ot 的患者中有 116 例显示为抗体阳性,阳性率为 51.79%,提示血清抗体在患病的后期或恢复期才能被检测到^[8],恙虫病早期快速诊断需依靠分子生物学技术。因此,建立早期诊断 Ot 的敏感实验方法,为临床早期诊断和早期治疗恙虫病提供新的途径是很有必要。实时荧光定量 PCR 实验条件的优化具有更准确、更可靠、灵敏度更高的检验结果,且能快速进行基因分析,自动化程度更高^[12]。本研究证实了优化实时荧光定量 PCR 技术在恙虫病早期诊断中的应用,是一种准确、可靠、快速的实验方法,适合在基层推广应用。

参考文献

- [1] PérezL J, Diaz de Arce H, Tarradas J, et al. Development and validation of a novel SYBR Green real-time RT-PCR assay for the detection of classical swine fever virus evaluated on different real-time PCR platforms[J]. J Virol Methods, 2011, 174(1/2): 53-59.
- [2] 赖名耀, 吴娜, 柳爱华, 等. 恙虫病东方体检测及分型的分子生物学技术进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(10): 782-798.
- [3] Bakshi D, Singhal P, Mahajan SK, et al. Development of a real-time PCR assay for the diagnosis of scrub typhus cases in India and evidence of the prevalence of new genotype of *O. tsutsugamushi*[J]. Acta Tropica, 2007, 104(1): 63-71.
- [4] Lu HY, Tsai KH, Yu SK, et al. Phylogenetic analysis of 56-kDa type-specific antigen gene of *Orientia tsutsugamushi* isolates in Taiwan[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 83(3): 658-663.
- [5] 詹银珠, 郭先国, 左小华. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志[J]. 2010, 28(4): 308-312.
- [6] Cheng A, Magdaleno S, Vlassov AV. Optimization of transfection conditions and analysis of siRNA potency using real-time PCR[J]. J Virol Methods, 2011, 175(1): 80-84.
- [7] Van Stelten A, Kreman TM, Hall N, et al. Optimization of a real-time RT-PCR assay reveals an increase of genogroup I norovirus in the clinical setting[J]. Methods Mol Biol, 2011, 764(1): 199-213.
- [8] 王誓闻, 张丽娟, 王园园, 等. 普通 TaqMan 探针及 TaqMan MGB 探针 real-time PCR 检测物形体 msp-2 基因方法的建立与比较[J]. 疾病监测, 2011, 26(1): 12-14.
- [9] 朱丽娜, 张品波, 陈梅岭, 等. 实时荧光定量 PCR 检测恙虫病东方体[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(3): 228-231.
- [10] Paris DH, Aulkkani 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(5): 488-495.
- [11] Sonthayanon P, Chierakul W, Wuthiekanun V, et al. Association of high *Orientia tsutsugamushi* DNA loads with disease of greater severity in adults with scrub typhus[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(2): 430-434.
- [12] Boltz VF, Maldarelli F, Martinson N, et al. Optimization of allele-specific PCR using patient-specific HIV consensus sequences for primer design[J]. J Virol Methods, 2010, 164(1/2): 122-126.