

• 论 著 •

梅毒感染诊断中 Tp0259-PCR 方法的建立^{*}

杨长顺¹, 王三虎¹, 周秀萍^{2△}

(1. 怀化市第一人民医院检验科, 湖南怀化 418000; 2. 湖南医药学院, 湖南怀化 418000)

摘要:目的 建立聚合酶链反应(PCR)方法扩增梅毒螺旋体 Tp0259 基因, 为进一步探讨其在梅毒感染诊断中的作用提供依据。方法 从 Genbank 获取 Tp0259 基因序列, 生物信息学分析, 设计特异性引物。收集 Tp Nichols 株感染组和对照组的新西兰兔睾丸标本, 提取全基因组 DNA, 通过优化 PCR 扩增条件寻找最佳反应体系和反应条件, PCR 扩增 Tp0259 的编码基因, 同时通过新构建扩增方法检测泌尿生殖道感染常见病原微生物。结果 通过 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳, 只有感染梅毒螺旋体的新西兰兔标本才能扩增出特异性条带, 条带位置约为 646 bp, 其他病原微生物未见扩增条带。结论 检测 Tp0259 基因能用于诊断梅毒螺旋体的感染。

关键词:梅毒螺旋体; 聚合酶链反应; 基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.045

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2232-02

Establishment of Tp0259-PCR for diagnosing infection of treponema pallidum^{*}

Yang Changshun¹, Wang Sanhu¹, Zhou Xiuping^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Huaihua, Huaihua, Hunan 418000, China; 2. Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China)

Abstract: Objective To establish a method for detection Tp0259 gene by PCR. To provide basis of diagnosis infection of treponema pallidum by detection Tp0259 gene. **Methods** Gene sequences of Tp0259 was obtained from Genebank and analysis by bioinformatics. Specific primers were designed. The whole genome was extracted from testis specimens of the New Zealand rabbits infected by treponema pallidum and control groups. The gene of Tp0259 was amplified by PCR under the optimization reaction conditions which was selected by many tests, using the new construction of amplification method to detect the common pathogenic microorganism in urinary and reproductive tract infection. **Results** Specific bands of 646 bp was appeared only in New Zealand rabbits which was infected by treponema pallidum, while none was in the control group and other pathogenic microorganisms. **Conclusion** Detection the Tp0259 gene could be used to diagnose infection of treponema pallidum.

Key words: treponema pallidum; polymerase chain reaction; gene

梅毒是由梅毒螺旋(TP)引起的一种危害极大的全世界流行的性传播疾病(STD)。梅毒是一种慢性的、系统的传染性疾病, 对健康危害程度仅次于艾滋病, 几乎可以累及全身各个器官, 导致功能障碍^[1]。由于至今缺乏疫苗, 自然感染 Tp 后机体可再感染, 因此早期诊断、早期治疗、发现和控制传染源是控制梅毒传播的重要措施。Tp0259 是梅毒螺旋体的天然蛋白, 序列比对(BLAST)分析表明, Tp0259 的编码基因具有高度的特异性, 可以用做靶基因来检测梅毒螺旋体的感染。本研究根据梅毒螺旋体基因序列, 自行设计筛选一对特异性寡核苷酸引物, 通过实验研究, 建立了检测梅毒螺旋体 Tp0259 基因的 PCR 方法, 为寻找诊断梅毒感染的新方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 Tp(Nichols)标准菌株、解脲支原体(Uu)标准株、人型支原体(Mh)标准株、淋球菌(NG)标准株和沙眼衣原体(CT)标准株由南华大学病原生物研究所惠赠。试验动物为健康新西兰兔, 雄性, 由南华大学动物实验中心提供。

1.2 仪器与试剂 Tp0259-PCR 采用美国 eppendorf AG 温度梯度 PCR 仪, 凝胶成像系统为美国的 UVP White/Ultraviolet Transilluminator, 电泳仪和电泳槽为北京六一仪器厂。DNA 提取试剂盒为上海生物工程公司提供, PCR 扩增相关试剂和 DNA 分子量标准等均为天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 全基因组 DNA 提取 将对照和感染 Tp Nichols 标准株 30 d 后的新西兰兔处死, 取睾丸组织剪碎, 按 DNA 提取试剂盒说明书操作提取 Tp 全基因组 DNA 模板, Uu 标准株、Mh 标准株、NG 标准株和 CT 标准株基因组按照试剂盒操作说明书进行提取。

1.3.2 PCR 引物设计与合成 从 Genbank 获取 Tp0259 基因序列(Access numuber: NC_000919), 应用 BLAST 软件分析在不同 Tp 临床株的保守区域及与其他物种的特异区域, 在此区域再用 NCBI/ Primer-BLAST 在线软件设计以下引物: 上游引物: 5'-3' ATG TAT CTT GTC TTC ATT GGG GTT C; 下游引物: 5'-3' GCG CGG ATT TGA GCA AAC TG, 引物由 Invitrogen 公司合成。以下为 Tp0259 的碱基序列(包括一部分上游序列和一部分下游序列)。蓝色字体的 ATG 为起始密码子, TAG 为终止密码子, 下划线表示上下游引物的位置, PCR 扩增产物为两条引物间的序列(共 646 个碱基)。GAT TTT CCC CAT GAG GTG GCA TGT ATC TTG TCT TCA TTG GGG TTC TGT GTG AAA ATG GGC CGC TAT TTT GTC CGG ATT GTG CGT GCA GTC TGG AGG AGG AGA CGA TGA TGA GGA AGC TTA GTA CGG GCC TGT TGC TGT GGA TTG CGT TTA TCT CGG GTG TTA CGT CCT GCA AGT CTG CGC CTC CGG CGG AGG AGC TCG TGG AAG TTG CGC CGC CTG TGG AGG AGC AGG AAG AAG AGC

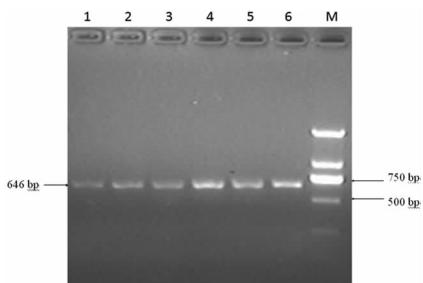
* 基金项目: 怀化市科技局课题(怀财企指[2013]4号 1-13); 湖南省教育厅课题(11C1014)。 作者简介: 杨长顺, 男, 副主任技师, 主要从事临床微生物检验工作研究。 △ 通讯作者, E-mail: xiupingzhou@163.com。

CCA TGA CGC CCG TCC CCG AGG AGC CGC AGG AGC
CTA TGG CAG TCG CTC CGC AAG AGG TGT CGC GTG
CTG AGT ACG TGG TCA AAA ACG AAG ACA CCC TTT
CTC AAA TTG CTA AAA AGT TTT ACG GCT CGC GCA
TCC GCG GAT ACT ATT TCC CCA TTA TTA TGG CCT
GTA GTG AGG GCG TGG TAA CGC ATC CAG ACC GCA
TTA GGC CAG GTA TGA AGT TGG TTA TTC CGA ACT
TTG ACG AGT TTA TGG CTG ATC CGG ATC ATG TCC
GCA AGG GGC TTG AGG CAT TCG CCC AGG TAG AGC
GTA TCT ATC GTT CTG AGG GTA AGA TGA AGC TAG
CTG AGT TTA TGA ACA AAC TCG GGG AAA AAA TCG
GCA AGA CCG ATC CTC GGG ACA TGC CGC GCT AGG
AGT CAC TGC GCG CCA GTT TGC TCA AAT CCG CGC
CGG GGT GGC AGC TG。

1.3.3 Tp0259-PCR 建立 通过改变退火温度,优化后 PCR 反应体系与反应条件。反应体系:2X Taq PCR MasterMix 12.5 μL、25 fmol/L 上下游引物各 1.0 μL、Tp 标准株 DNA 模板或 PBS(阴性对照)1 μL、加双蒸水补足至 25 μL。扩增条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s、59 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 40 s,共 40 个循环;72 °C 终延伸 5 min。取扩增产物 10 μL,DNA 标记物 5 μL 用 1.5% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 35 min,核酸染料染色观察,凝胶成像系统记录结果。

2 结 果

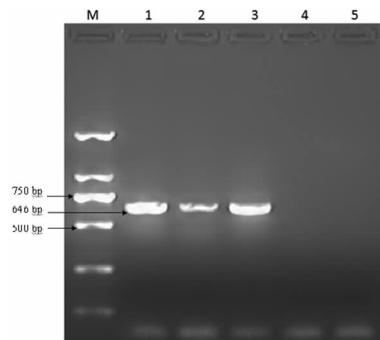
2.1 退火温度优化结果 不断改变退火温度,通过图 1 发现在电泳图 4 号孔位条带最清晰,最后选择退火温度为 59.0 °C。



M:DNA 标记物(DL2000);1:53 °C;2:55.7 °C;3:57.3 °C;4:59.0 °C;5:60.3 °C;6:63 °C。

图 1 Tp0259 温度梯度 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 PCR 扩增结果 PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中结果见图 2,可见感染 Tp 的新西兰兔标本在 646 bp 左右位置见一特异性条带,与预期 DNA 片断大小(包含引物片段)一致,而对照新西兰兔标本未能扩增出任何条带。

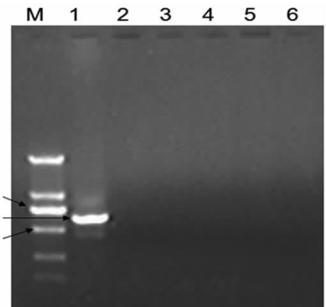


M:DNA 标记物;1~3:感染 Tp 的新西兰兔标本;4~5:对照新西兰兔标本。

图 2 Tp0259 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 特异性检测结果 新构建 PCR 扩增方法特异性检测见图 3,可见感染 Tp 的新西兰兔标本在 646 bp 左右位置见一特

异性条带,而泌尿生殖道常见感染病原菌均未见扩增条带。



M:DNA 标记物(DL2000);1:Tp 标准株;2:阴性对照;3:NG 标准株;4:Uu 标准株;5:Mh 标准株;6:CT 标准株。

图 3 新构建扩增方法特异性检测结果

3 讨 论

目前实验室诊断最常用方法是血清学方法^[2]。梅毒螺旋体感染一般可产生至少两种抗体,包括非特异性抗体即反应素和特异性的梅毒抗体。传统的血清学方法包括初筛方法如甲苯胺红不加热血清学试验(TRUST)和快速血浆反应素试验(RPR),和确诊试验如密螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)^[3]。但是在梅毒感染早期,机体不能及时产生抗体,因此依赖抗体检测的血清学试验对出现下疳前梅毒的诊断效果并不理想^[4]。由于目前梅毒螺旋体的基因序列已经测序完成,以分子水平为基础的 PCR 检测方法,以其高灵敏度和高特异度的优点成为早期梅毒检测的重要手段。郭文秀等^[5]通过比较发现在实际检测中,由于检测对象的不同,只有 PCR 可以在一期内梅毒的潜伏期进行检测。目前针对梅毒螺旋体检测的靶基因已有 tpf-1、BMP、tmp、47kDa 蛋白基因及 16S rRNA 等,但这些基因大部分与其他微生物具有同源性,扩增时容易出现假阳性,因此需要寻找梅毒螺旋体更为特异的靶基因。BLAST 分析表明 Tp0259 的编码基因具有高度的特异性,可以用做靶基因来检测梅毒螺旋体的感染。本研究应用 BLAST 分析 Tp0259 基因,设计特异性引物。PCR 敏感性主要影响因素为退火温度和 Mg 离子浓度,通过反复摸索反应条件,发现在 59 °C 退火时产物最多、条带最亮,以此作为优化后的反应体系和条件,建立 PCR 扩增 Tp0259 基因。利用所建立的 PCR 法成功地从感染 Tp Nicholls 标准株新西兰兔的睾丸组织中扩增出该基因,但在对照新西兰兔标本中和泌尿生殖道常见感染病原菌均未见扩增条带。说明 PCR 扩增该基因能够区分是否感染梅毒螺旋体,显示出 Tp0259 基因的诊断价值。下一步将收集临床一期梅毒标本,评价检测该基因诊断梅毒的灵敏度和特异度,并与目前常用梅毒检测方法进行比较,以寻找诊断一期梅毒诊断最佳的方法,为梅毒感染早诊断、早治疗提供科学依据。

参考文献

- [1] 廖群,刘小玲,郭惠.时间分辨免疫荧光法用于梅毒抗体测定的探讨[J].中国实验诊断学,2014,3(18):447-450.
- [2] Serwin AB, Chodyncka B. Serological diagnosis of syphilis—current problems and controversies[J]. Przegl Epidemiol, 2009, 63(4):519-523.
- [3] 周秀萍,杨长顺,刘志杰,等.三种梅毒检测方法的应用评价[J].检验医学与临床,2010,7(17):1851.
- [4] 吴劲松.RPR 与 TPPA 检测对梅毒诊断及疗效的价值分析[J].中华医院感染学杂志,2011,21(2):416-417.
- [5] 郭文秀,孙志,云华,等.梅毒检测方法新进展[J].中国国境卫生检疫杂志,2012,35(6):419-424.