

巢式 PCR 检测梅毒螺旋体 DNA 方法研究

王佃鹏, 易娟, 张艳芳, 汤海燕, 邓丽丹, 罗斌, 李培茂, 张志敏, 董向东

摘要:目的 建立一种血清梅毒螺旋体 DNA 提取及 PCR 鉴定方法。方法 基于化学热裂解法和柱式核酸提取原理进行血清梅毒螺旋体 DNA 提取。根据文献筛选优化引物建立巢式 PCR 检测体系,并对实验方法的特异性、抗干扰性、检测梯度进行评价。结果 建立的实验方法特异性好、抗干扰性强,对 TRUST 为 1:8 以上的标本检测全部为阳性。结论 提取梅毒螺旋体 DNA 及 PCR 鉴定有助于梅毒的快速诊断,对于血液中梅毒螺旋体增殖能力判断具有重大潜在应用价值。

关键词:梅毒螺旋体;DNA 提取;巢式 PCR

中图分类号:R377.1 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)2-188-03

Methodological study on detection of *Treponema pallidum* DNA with nested PCR. WANG Dian-peng, YI Juan, ZHANG Yan-fang et al.(Shenzhen Hospital for Occupational Disease Prevention and Treatment; Shenzhen 518001 Guangdong, P. R. China)

Abstract Objective To establish a method for detecting serum *Treponema pallidum* DNA with nested PCR detection. Methods Serum *Treponema pallidum* DNA was extracted on the basis of chemical pyrolysis method and principles of nucleic acid extraction column. According to the literature primers were screened and optimized and established the nested PCR detection system. The findings of specificity anti-interference and gradient test were evaluated and the clinical specimens were tested. Results This experimental method was extremely specific and showed a strong anti-interference features. The clinical detection showed that the samples with syphilis toluidine red untreated serum test (TRUST) titre 1:8 or above were all positive. Conclusion Both serum *Treponema pallidum* DNA extraction and nested PCR detection allow rapidly diagnosis of syphilis and that show great potential for confirming proliferative ability of *Treponema pallidum* in blood.

Key words: *Treponema pallidum*; DNA extraction; Nested PCR

梅毒是一种严重的性传播疾病,特别是疾病发展成神经梅毒后,给患者带来巨大的痛苦,同时也给公共卫生带来巨大挑战^[1]。近年来,我国梅毒流行趋势一直呈增长态势,2010 年梅毒发病人数为 358 534 人,死亡人数为 69 人。

梅毒的实验室诊断方法主要以甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)初筛,以梅毒螺旋体特异性抗体颗粒凝集试验(TPPA)确证,但限于 TRUST 方法的局限性,容易产生假阴性,而且不能够对患者血液中梅毒螺旋体有效定量分析^[2,3]。21 世纪分子生物技术快速,PCR 技术已经成为许多病原体实验室诊断的重要工具。本研究拟建立一种血清梅毒 DNA 提取及 PCR 鉴定方法,以便有助于梅毒的早期诊断临床治疗和传染的危险性评估。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及样本 TP-Nichols 标准株 1 株(由西北大学黄宗炎提供),26 例样本分别采用 TRSUT 初筛阳性并用 TPPA 确证的血清标本。其他阳性病原体包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、EB 病毒感染血清标

本,每位患者分别抽取血液 3ml 标本离心取血清。阴性及干扰实验标本包括 TRSUT 初筛和 TPPA 同时检测为阴性的血清标本以及人类基因组 DNA。

1.1.2 试剂及仪器 生化试剂购自上海生工生物工程公司,PCR 试剂购自大连宝生物公司生产的 premix extaq 试剂。PCR 仪器为美国伯乐公司生产的 Bio-Rad PCR 扩增仪。

1.2 方法

1.2.1 梅毒 DNA 提取液的配制 SDS 0.1g,0.5M EDTA 2ml,1.3 1M Tris-hcl 0.5ml,Triton X-100 0.5ml,H₂O 36ml 调节 PH 值 8.0~8.3,用水补足总体积为 50ml 冰箱冷藏备用。

1.2.2 血清梅毒 DNA 的提取 取配制好的梅毒 DNA 提取液 50μl,加入血清 200μl,强烈振荡 30sec 后,100℃加热 10min,然后冰浴 2min,14 000rpm 离心 3 min,吸取全部上清液体,转入一新的 eppendorf 管中,加入 6μl 3mol/L 醋酸钠溶液,再加入 180μl 无水乙醇,振荡混匀后转入离心柱。12 000rpm 离心 1min,加入 TE 和无水乙醇配制的 75%乙醇 800μl,离心 1min,换离心管后 14 000rpm 离心 3min。在离心柱内加入 50μl

作者单位:深圳市职业病防治院 广东 深圳 518001

作者简介:王佃鹏(1978-),男,硕士研究生、主管检验师,主要从事病原分子生物研究。

TE 溶液放置 1min 后, 更换新的 eppendorf 管离心 1min, 即得 DNA 溶液。

1.2.3 PCR 扩增 结合参考文献设计优化引物, 巢式 PCR 以 TP- 47K、TP- 47KA 为外引物, TP- KO3、TP- KO3A 为内引物扩增^[4], 见表 1。第一轮反应体系均为 50μl, 采用 Takara 公司生产的 PREMIX EXTaq 试剂。第一轮反应 PREMIX EXTaq 预混液 25μl, 浓度为 10pmol/μl TP- 47K 和 TP- 47KA 引物各 2μl, 灭菌水 6μl, DNA 溶液 20μl。扩增条件 94℃ 2min(30sec), 56℃ 30sec, 72℃ 48sec 共 36 循环, 72℃ 5min; 第二轮反应体系均为 50μl。第二轮反应 PREMIX EXTaq 预混液 25μl, 浓度为 10pmol/μl TP- KO3 和 TP- KO3A 引物各 2μl, 灭菌水 21μl, 第一轮扩增产物 5μl。扩增条件: 94℃ 2min, (94℃ 30sec, 55℃ 30sec, 72℃ 30sec 共 40 循环), 72℃ 5min。取扩增产物 10μl, 用预加入 SYBR Green 染料的 2% 琼脂糖电泳(200V, 25min), 凝胶成像仪分析结果。内引物预期扩增 261bp 的 DNA 片段。

表 1 巢式 PCR 引物序列表

Table 1 Nested PCR primers

名称 Name	序列 Sequence	碱基数 No.base
TP- KO3A	5'- GAAGTTTGTGCCAGTTGCGGTT- 3'	22
TP- KO4	5'- CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA- 3'	21
TP- 47K	5'- GTTGAGGTATTGGGCGAAAA	20
TP- 47KA	5'- ATACCCGTTTCGCAATCAAAG	20

1.2.4 特异性及抗干扰性实验 运用本实验建立的检测方法分别对 TP- Nichols 标准株、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、EB 病毒感染者血清标本进行检测。阴性及干扰实验标本包括 TRSUT 初筛和 TPPA 同时检测为阴性的血清标本(包括脂血及溶血标本)以及人类基因组 DNA。

1.2.5 检测滴度实验 对 TRUST 检测结果分别为 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 的标本进行检测。

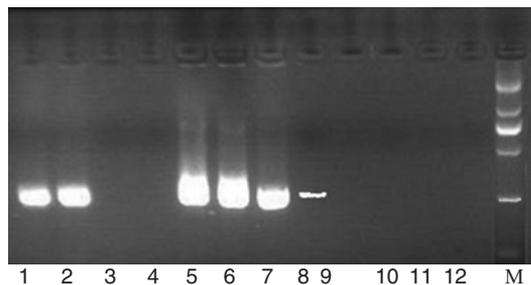
1.2.6 临床标本的检测 26 例分别采用 TRSUT 初筛阳性并用 TPPA 确证的血清标本进行检测分析。

2 结果

2.1 特异性的检测 TP- Nichols 标准株经巢式 PCR 扩增结果为阳性, 乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、EB 病毒感染者血清标本均为阴性。TRSUT 初筛和 TPPA 同时检测为阴性的血清标本(包括脂血及溶血标本)以及人类基因组 DNA 巢式 PCR 扩增结果为阴性。这一检测结果表明该方法有很好的特异性和抗干扰性(图 1)。

2.2 检测滴度实验 TRUST 检测结果分别为 1:1, 1:2, 1:4 的标本无目的片段扩增, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 巢式 PCR 扩增结果为阳性, 而且随着比例增大电泳凝

胶成像条带逐渐增大(图 1)。



注 (1 为 TP- Nichols 标准株, 2 为阳性样本, 3 为阴性对照, 4 为人类基因组 DNA, 5~12 为 TRUST1:128-1:1 样本)

Note 1 represent TP- Nichols standard strains, 2 represent positive samples, 3 represent a negative control, 4 represent the human genome DNA, 5-12 represent TRUST1:128-1:1 sample)

图 1 巢式 PCR 琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of nested PCR

2.3 临床标本的检测结果 26 例分别采用 TRSUT 初筛阳性并用 TPPA 确证的血清标本经巢式 PCR 扩增, 14 例阴性, 12 例阳性; 阴性标本中 10 例 TRSUT 检测结果为小于 1:8, 2 例 TRSUT 检测结果为 1:8; 阳性标本中 11 例 TRSUT 检测结果为大于 1:8, 1 例 TRSUT 检测结果为 1:8。

3 讨论

梅毒血清学筛查试验包性病研究实验室抗原实验(VDRL)、TRUST、TPHA、TPPA、梅毒螺旋体荧光抗体试验(FTA)、梅毒螺旋体酶免疫测定(EIA), 这些实验的检测靶为 IgG 抗体和 / 或 IgM 抗体。VDRL/TRUST 实验的阳性率为 70%~80%, TPHA/TPPA 实验的阳性率为 70%~80%, EIA 实验的阳性率为 85%~90%, 与 FTA- ABS 实验的阳性率为 85%~90%^[5,6]。这些方法的阳性率都比较高, 但不能确定血液中是否还存在活的螺旋体。目前基于检测靶为梅毒螺旋体核酸的检测方法为 PCR, 但多数研究是检测生殖器组织疱疹或渗出液, 不能反映体内血液中病原体增殖情况。

血液或血清中检测梅毒螺旋体核酸的难点是其核酸提取。大量的文献检索发现血液或血清提取梅毒螺旋体核酸成功率不高。本研究根据 DNA 类病原体核酸提取常用方法进行改进优化, 设计了化学加热裂解柱式提取的方法, 既浓缩提高 DNA 浓度并且能够有效去除 PCR 抑制剂。本研究提供了一套高效的梅毒血清 DNA 提取方法, 有助于各种梅毒方面分子生物研究和临床应用。

本研究大量筛选各种梅毒螺旋体核酸 PCR 实验方法所用引物, 并经 NCBI 数据库精细比对, 排除了与人类基因组等各种其他病原体高度同源的可能性, 选择了两对引物进行 PCR 实验。实验的结果特异性好, 无假阳性, 片段长度适中上有利于通过凝胶成像鉴定

和测序。本研究中几例标本发现 TRUST 1 8 以上都呈PCR 阳性,为以后血液中梅毒螺旋体增殖能力评价奠定了实验基础。

本研究建立的实验方法有助于梅毒的快速诊断,在一些抗体检测结果可疑时运用该方法可以有效的进行辅助诊断。

参考文献:

[1] Zhang YJ Shang YH . 1 200 cases of syphilis epidemiology analysis [J]. Tropical Medicine 2010 6(10) :753-754.(In Chinese)
(张艳杰,尚艳华. 200 例梅毒流行病学分析[J]. 热带医学杂志, 2010 6(10) :753-754.)

[2] Casal CA Silva MO ,Costa IB et al . Molecular detection of Treponema pallidum sp . pallidum in blood samples of VDRL-seroreactive women

with lethal pregnancy outcomes :A retrospective observational study in northern Brazil[J]. Rev Soc Bras Med Trop 2011 7(22) 37-47.

[3] Craig Tipple ,Mariam O F Hanna ,Samantha Hill et al . Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection [J]. Sex Transm Infect 2011 7(12) :1136-1141.

[4] H M Palmer S P Higgins ,A J Herring ,M A Kingston.Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom[J]. Sex Transm Infect 2003 79 :479-483.

[5] Wicher K ,Horowitz HW ,Wicher V . Laboratory methods of diagnosis of syphilis for the beginning of the third millennium [J]. Microbes Infect 1999 12 :1035-1049.

[6] Rompalo AM ,Lawlor J Seaman P et al . Modification of syphilitic genital ulcermanifestations by coexistent HIV infection[J]. Sex Transm Dis 2001 28 :448-454.

收稿日期 :2011- 06- 24 编辑 符式刚

·短篇论著·

淄博市 2007~2010 年水痘流行病学特征分析

王萍¹ 秦爱玲¹ 黄振水¹ 张丽¹ 徐凌忠^{2*}

摘要:目的 了解淄博市 2007~2010 年水痘的流行病学特征,为有效控制水痘提供依据。方法 对淄博市 2007~2010 年疾病监测信息报告系统上报的水痘病例进行描述性流行病学分析。结果 淄博市 2007~2010 年共报告水痘病例 6223 例,水痘年均发病率为 36.16/10 万。以 4~5 月和 12 月及次年的 1 月为发病高峰。以 15 岁以下学生、儿童居多,≤ 14 岁儿童发病率为 202.83/10 万。2007~2010 年全市共报告水痘事件 14 起,全部发生在学校。结论 15 岁以下人群是水痘的高发人群,乡村小学是水痘事件发生的重要场所,淄博市水痘疫情较严重。应加强学校和托幼机构对水痘病例的监测,及时采取隔离病例,接种水痘疫苗,控制疫情的发生。建议将水痘纳入免疫规划管理。

关键词 水痘 流行病学特征

中图分类号 R511.5 文献标识码 A 文章编号 :1009- 9727(2012)2- 190- 03

Epidemiological characteristic of varicella in Zibo City in 2007~2010. WANG Ping ,QIN Ai-ling ,HUANG Zhen- shui et al. (Zibo Municipal Center for Disease Control and Prevention Zibo 255026 Shandong P. R. China ; Corresponding author :XU Ling-zhong E-mail :lzxu@edu.deu.cn)

Abstract Objective To analyze the epidemiological characteristics of varicella in Zibo City in2007~2010 and provide basis for varicella control. Methods All the varicella data in Zibo were collected from Disease Surveillance Information Reporting System and Public Health Emergency Events Reporting System of Chinese Information System for Disease Control and Prevention and analyzed with descriptive statistics. Results Totally 6 223 varicella cases were reported in Zibo in 2007 to 2010.The average incidence of varicella in 2007~2010 was 36.16/100 000. Most of cases occurred in spring and winter and most of them were pupils under the age of 15 years. Incidence of varicella in pupils under 14 years old was 202.83/100 000. In 2007~2010 ,14 outbreaks occurred in schools. Conclusion Children under 14 years old were the high risk population. The village elementary school is the focus of varicella indicating the nessesity for strengthening the monitoring of varivella infection in elementary schools and enhancement of varicella vaccine coverage.

Key words: Varicella; Epidemiology

水痘是由水痘一带状疱疹病毒 (Varicella-zoster virus , VZV)引起的一种常见急性呼吸道传染病,表现为分批出现的

作者单位 :1.淄博市疾病预防控制中心,山东 淄博 255026 ; 2.山东大学公共卫生学院,山东 济南 250000

作者简介 王萍(1970~),女,山东淄博人,本科,副主任医师,研究方向:免疫规划管理。

* 通讯作者 :E- mail lzxu@edu.deu.cn