

Real-time PCR与常规PCR在Q热立克次体检测中的比较

亚红祥^{1*}, 张丽娟^{2*}, 张云智¹

1. 云南省地方病防治所/云南省病毒立克次体研究中心, 云南省自然疫源性疾病预防技术重点实验室, 云南 大理 671000;

2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206

摘要: **目的** 比较与评价 Real-time PCR 与常规 PCR, 寻求适合于 Q 热患者早期诊断的方法。 **方法** 应用 TaqMan 探针定量 PCR、SYBR Green 染料定量 PCR、巢式 PCR 和普通 PCR 四种方法分别对 T-A 克隆的 Q 热立克次体基因 htpAB 片断进行灵敏性、特异性和重复性检测及评价。 **结果** TaqMan PCR 方法的灵敏度分别为 SYBR Green PCR、巢式 PCR 和普通 PCR 的 10 倍、10 倍和 100 倍。重复性测试 TaqMan 法 Ct 变异系数 CV: 0.2%~3.0%, SYBR Green 法的 CV: 0.3%~6.0%。TaqMan 和 SYBR Green PCR 均耗时约 1h, 巢式 PCR 耗时约 2.5h, 普通 PCR 耗时约 1.5h。四种方法检测 25 种相关病原菌结果均为阴性。 **结论** TaqMan 探针定量 PCR 方法具有很好的特异性、灵敏性、重复性和可操作性, 可用于 Q 热患者临床早期诊断。

关键词: Q 热立克次体; Q 热; Real-time PCR; 常规 PCR; 评价

中图分类号: R376 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2014)9-1054-03

Comparison of detection of *Coxiella burnetii* by real-time PCR and conventional PCR methodYA Hong-xiang¹, ZHANG Li-juan, ZHANG Yun-zhi

1. Yunnan Institute of Endemic Diseases Control and Prevention/Yunnan Center of Virus and Rickettsia Research/Yunnan Key Laboratory of Natural Focus Disease, Dali 671000, Yunnan, China;

Corresponding author: ZHANG Li-juan, E-mail: zhang lojuan@icdc.cn

Abstract: **Objective** To compare the detection effect of *Coxiella burnetii* by the real-time PCR and conventional PCR for early diagnosis of Q fever patients. **Methods** T-A cloned the fragment of *Coxiella burnetii* htpAB gene as the target sequence were amplified by real-time PCR assay (TaqMan PCR and SYBR Green PCR) and conventional PCR (nested PCR and general PCR). **Results** The sensitivity of TaqMan PCR was 10 times higher than that of SYBR Green PCR 10 times higher than that of nested PCR, and 100 times higher than that of general PCR. The coefficients of Ct variation (CV) of TaqMan PCR and SYBR Green PCR were 0.2%~3.0% and 0.3%~6.0%, respectively. It took about an hour to complete a test for both TaqMan and SYBR Green PCR, about 2.5 hours for nested PCR, and about 1.5 hours for general PCR. The results of detection of DNA of 25 species of DNA from rickettsia and other common agents were all detected for negative by the four methods respectively. **Conclusion** These results showed that TaqMan PCR for detecting *Coxiella burnetii* was the most specific, sensitive, repeating and operable in four methods, and it can be used for early clinical diagnosis of Q fever patients.

Key words: *Coxiella burnetii*; Q fever; Real-Time PCR; Conventional PCR; Evaluation;

Q 热(Q fever)是一种呈世界性分布的人兽共患疾病,其病原体为贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*),俗称 Q 热立克次体^[1]。Q 热立克次体对干燥抵抗力极强,在外界环境中可长期存活,又可通过气溶胶传播,在国际上被视为生物战剂^[2]。该病原体通过在家畜或农场动物中隐性感染而持续存在,人和动物普遍易感^[1]。Q 热早期应用抗生素有效,发展成为慢性难于治疗,并发症也多,死亡率较高^[3-4],因此早期诊断对该病相当重要。该病在临床上表现常无特异性,极易误诊、漏诊,通常需要实验室检测才能确诊^[5]。以往的病原分离法和血清学方法由于敏感性较差,而不能用于病人的早期诊断。本次研究以 T-A 克隆 Q 热立克次体 htpAB 基因片断作为 DNA 定性和定量模板,分别进

行了 TaqMan 探针定量 PCR、SYBR Green 染料定量 PCR、巢式 PCR 和普通 PCR 方法检测与评价,目的是为了寻找一种对 Q 热患者早期快速诊断的方法。

1 材料与方法

1.1 立克次体及其他细菌 DNA 普氏、莫氏、康氏、立氏、西伯利亚、非洲、黑龙江、日本、小珠、Q 热立克次体以及恙虫病东方体、查菲埃立克体、人粒细胞无形体、汉赛巴尔通体、伊丽沙白巴尔通体、杆状巴尔通体、伤寒杆菌、霍乱弧菌、嗜肺军团菌、流感嗜血杆菌、结核分枝杆菌、炭疽芽胞杆菌、痢疾杆菌、李斯特氏菌、伯氏疏螺旋体、巴氏菌共 26 种 DNA,均为中国疾病预防控制中心传染病所保存。

1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶(北京赛百盛基因

作者简介: 亚红祥(1979~),男,硕士,主管医师,研究方向:立克次体病防治。

***通讯作者:** 张丽娟, E-mail: zhang lojuan@icdc.cn; 亚红祥, E-mail: yahongxiang@163.com

技术有限公司)、pGM-T克隆试剂盒(北京天根生化科技有限公司)、质粒小提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)、DNA回收试剂盒(BIOBASIC INC)、SYBR® Premix Ex Taq™(大连宝生物工程有限公司)、TaqMan® Universal PCR Master Mix(2×)(上海基康生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器 PCR扩增仪(MJ Research公司, PTC-100™)、核酸定量分析仪(Nano Drop公司, TBL-N2)、荧光定量PCR仪(FQD-48A型,杭州博日科技有限公司)、凝胶成像仪。

1.4 标准DNA模板与普通PCR 参考文献^[6]中的引物IS111F1、IS111R1(北京赛百盛基因技术有限公司合成)及条件进行普通PCR,扩增Q热立克次体hspAB基因485bp的片段,将该片段纯化回收后,与T载体连接,构建重组质粒作为标准DNA模板。核酸定量仪测量该模板浓度为163.23ng/μL,依公式^[7]:模板拷贝数(copy/μL)=DNA含量(g/μL)/片段大小×615(Da)×1.67×10⁻²⁴(g),计算该标准DNA模板的拷贝数,将其倍比稀释作为PCR模板。

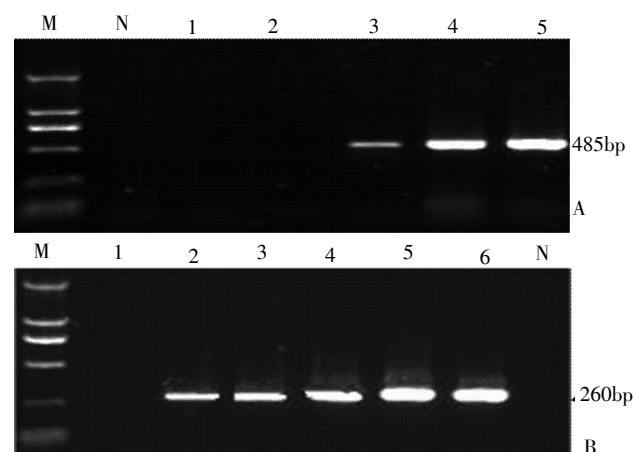
1.5 巢式PCR 采用25μL体系,第一轮:10×Taq缓冲液2.5μL,10×PCR染料2.5μL,10μM引物IS111F1和IS111R1各1.0μL^[6],dNTPs 0.5μL,模板2.0μL,Taq DNA聚合酶0.5μL,补无菌水至25μL;反应条件为95℃ 8min后,以95℃20s、52℃30s、72℃30s循环35次,68℃ 5min。第二轮:以1.0μL第一轮产物为模板,10×Taq缓冲液2.5μL,10×PCR染料2.5μL,10μM引物IS111F2和引物IS111R2各1.0μL,dNTPs 0.5μL,Taq DNA聚合酶0.5μL,补无菌水至25μL;反应条件为95℃8min后,以95℃20s、50℃30s、72℃30s循环35次,68℃ 5min。取4μL PCR产物在1.5%琼脂-溴化乙锭凝胶中电泳约30min,目的片段大小为260bp。

1.6 SYBR Green染料定量PCR 每个反应中含12.5μL通用PCR反应混合物(SYBR® Premix Ex Taq™(2×)),引用文献中10μM引物IS111F2和IS111R2各1μL^[6],DNA模板2μL,补无菌水至25μL。反应条件为95℃ 30s后,以95℃ 5s、60℃ 20s和72℃ 30s循环40次,72℃ 1min。

1.7 TaqMan探针定量PCR 每个反应中含12.5μL通用PCR反应混合物[TaqMan® Universal PCR Master Mix(2×)],引用文献中的引物IS111-Fp及IS111-Rp 10μM各1μL,10μM探针IS111-Taqman-Probe(上海基康生物技术有限公司合成)0.25μL^[8],2μL DNA模板,补无菌水至25μL。反应条件为50℃2min和95℃10min后,以95℃ 15s和60℃ 1min循环50次,扩增产物102bp。

2 结果

2.1 敏感性分析 将标准DNA模板稀释为拷贝数(copy/μL):10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、10⁰,分别进行普通、巢式、SYBR Green和TaqMan PCR扩增,检测到的灵敏度分别为10³copy/μL、10²copy/μL、10²copy/μL、10¹copy/μL;SYBR Green和TaqMan两种定量PCR标准曲线的循环阈值(Ct)与模板拷贝数均呈良好的线性关系, $r=-0.999$ 。见图1~2。

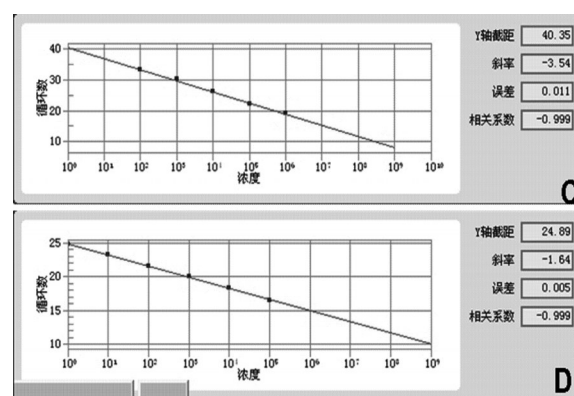


注:A:普通PCR检测;B:巢式PCR检测;M:DL2000bp;N:阴性对照;1: 10¹;2: 10²;3: 10³;4: 10⁴;5: 10⁵;6: 10⁶。

Note: A: Detection of general PCR;B: Detection of nested PCR; M: DL2000bp; N: Negative control; 1: 10¹; 2: 10²; 3: 10³; 4: 10⁴; 5: 10⁵; 6: 10⁶。

图1 常规PCR灵敏性检测

Fig.1 Sensitivity detection of conventional PCR



注:C: SYBR Green PCR建立的标准曲线($r=-0.999$);D: TaqMan PCR建立的标准曲线($r=-0.999$)。

Note: C: Standard curve generated from SYBR Green PCR($r=-0.999$)

D: Standard curve generated from TaqMan PCR($r=-0.999$)

图2 Real-time PCR标准曲线

Fig.2 Standard curves of Real-time PCR

2.2 特异性分析 用普通、巢式、SYBR Green和TaqMan四种PCR法分别检测普氏、莫氏、康氏、立氏、西伯利亚、非洲、黑龙江、日本、小珠、Q热立克次体以及恙虫病东方体、查菲埃立克体、人粒细胞无形体、汉赛巴尔通体、伊丽沙白巴尔通体、杆状巴尔通体、伤寒杆菌、霍乱弧菌、嗜肺军团菌、流感嗜血杆菌、结核分枝

杆菌、炭疽芽胞杆菌、痢疾杆菌、李斯特氏菌、伯氏疏螺旋体、巴氏菌共26种DNA,结果仅检测到Q热立克次体,其它25种均检测阴性。

2.3 重复性分析 SYBR Green和TaqMan定量PCR均经过不同批次的样品和试剂进行重复性实验,结果SYBR Green法Ct变异系数CV: 0.3%~6.0%,TaqMan法的CV: 0.2%~3.0%。

2.4 运行时间 完成一次TaqManPCR需时约1h,SYBR Green PCR需时约1h,巢式PCR需时约2.5h,普通PCR需时约1.5h。

3 讨论

随着分子生物学技术的飞速发展,各种各样的检测方法已应用于各种病原体的检测,尤其是PCR方法的出现及其成熟应用,给临床病人的早期诊断提供了极大的帮助。普通PCR是一种简便、灵敏、特异的检测方法,在Q热立克次体的检测中目前已代替了病原分离法。Q热菌血症的人或动物体内的病原体含量极低,在感染早期较难检测到病原体,由此需要一种灵敏性更好的检测方法。近些年一种更加灵敏的巢式PCR也在Q热检测中得到了应用,由此也增加了检测时间和假阳性的风险。Real-time PCR方法的出现,至今已成熟应用于病原检测,并有效解决了常规PCR无法定量、易污染、灵敏性差等问题^[9-11],尤其近年随着新发传染病的不断涌现,该方法也在临床早期诊断中发挥了极其重要的作用。

本次研究以T-A克隆的Q热立克次体基因htpAB片段作为绝对定量和定性模板,利用国产荧光定量PCR仪(FQD-48A型,杭州博日科技有限公司)进行Real-time PCR(TaqMan探针定量PCR和SYBR Green染料定量PCR),并与常规PCR(巢式和普通PCR)进行比较与评价。结果两种Real-time PCR均耗时约1h,全封闭式反应,自动化控制。TaqMan PCR法是根据特异性基因片断设计特异性引物和探针,引物和探针同时与模板相结合,对目的基因进行双重特异性识别;而SYBR Green PCR法是利用SYBR Green I染料在PCR扩增时嵌入DNA双链(dsDNA)发出荧光信号,它能与任何dsDNA结合,易产生假阳性信号^[12-13]。两种定量PCR相比,TaqMan PCR重复性、特异性、灵敏性均较好,操作也最为简便,SYBR Green PCR成本低,但灵敏度与TaqMan PCR相差10倍。Real-Time PCR与常规PCR相比,操作简便,无需反应后续过程,不易污染,比常规PCR至少省时1.5~0.5h,而巢式PCR最易污染且操作最为烦琐、费时。在四种方法中,TaqMan PCR的灵敏度是普通PCR的

100倍,特异性和重复性最好,操作最为简便、快速,在Q热的早期检测中比其它三种方法具有很明显的优势。

虽然TaqMan PCR与常规PCR相比具有特异性和敏感性更强、自动化程度较高、定量准确、全封闭式反应、实时监测、减少了假阳性结果等优点,但TaqMan PCR也存在一些不足,如反应条件需要进行反复优化、需要制备标准品来建立标准曲线、不能检测目的片断大小、仪器及试剂成本较高、荧光素种类以及检测光源的局限性等限制了它的应用。TaqMan PCR引物及探针的设计与Mg²⁺浓度、引物浓度、探针浓度、退火温度及循环参数均会影响到最终结果,还有不同实验室建立的方法所得到的结果也会有一定的偏差,从而阻碍该技术的广泛推广。但是随着分子生物学、荧光技术等诸多技术的日益发展成熟以及各种困难逐渐被攻克,TaqMan PCR今后将会在临床早期诊断上有更加广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 俞东征主编.人兽共患传染病学[M].北京:科技出版社,2009:657-668.
- [2] 张丽娟.中国立克次体病监测及防治现状与展望[J].疾病监测,2007,22(9):577-579.
- [3] Zhang LJ, Fu XP, Zhang JS. Q fever endocarditis with multi-organ complication: a case report [J]. Chin Med J, 2006, 119 (18):1580-1582.
- [4] Karakousis PC, TrucksisM, Dumler JS. Chronic Q fever in the United States [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(6): 2283-2287.
- [5] 魏文进,温博海. Q 热疫苗研究进展 [J]. 微生物学免疫学进展, 2004, 32(3): 64-68.
- [6] Fenollar F, Fournier PE, Raoult D. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q Fever endocarditis or vascular infection [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11): 4919-4924.
- [7] 张晶波,温博海,陈梅玲,等.实时荧光定量PCR检测汉赛巴通体[J].中华流行病学杂志,2007,28(3):277-281.
- [8] 亚红祥,赫兢,张丽娟,等.贝氏柯克斯体实时荧光定量PCR方法的建立及对云南鼠标本检测[J].传染病信息,2009,22(6):345-347.
- [9] Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics [J]. Adv Clin Chem, 2005(2):40:219-259.
- [10] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction [J]. MolAspects Med, 2006, 27(2-3): 95-125.
- [11] Tse C, Capeau J. Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids [J]. Ann Biol Clin, 2003, 61(3):279-293.
- [12] Arya M, Shergill IS, Williamson M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(2):209-219.
- [13] Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR [J]. Adv Physiol Educ, 2005, 29(4): 151-159.

收稿日期:2014-05-20 编辑:符式刚