

副结核荧光 PCR 试剂盒研制与应用

陈茹^{1*} 刘中勇¹ 高小博² 刘志玲³ 吴晓薇¹ 曾碧健¹ 罗长保¹ 林志雄¹

(1. 广东出入境检验检疫局 广东 广州 510623)

(2. 北京盈九思科技发展有限公司 北京 100081)

(3. 华南农业大学 广东 广州 510642)

摘要: 采用 TaqMan 荧光标记探针技术原理, 建立副结核分枝杆菌特异的实时荧光 PCR 快速检测鉴定方法并组装形成临床诊断试剂盒。试剂盒提供荧光 PCR 与样品核酸提取试剂, 检测全程包括样品处理可在 1 d 内完成。特异性试验结果表明, 试剂盒对 8 株副结核分枝杆菌标准菌株的检测均呈典型阳性反应, 对牛分枝杆菌、结核分枝杆菌等其它 12 种分枝杆菌标准菌株以及大肠杆菌、肺炎链球菌等多种常见微生物均呈阴性反应。试剂盒检测灵敏度可达单个菌细胞、15 个基因拷贝, 比常规 PCR 检测灵敏度提高 100 倍。对每份添加 50~100 个菌细胞的 20 份阴性牛奶样品进行检测, 均呈阳性反应。重复性试验结果显示, 试剂盒组内变异系数为 1.41%, 组间变异系数为 2.42%。采用所研制的副结核分枝杆菌荧光 PCR 试剂盒对来自广东地区 7 个奶牛场的 250 份牛奶样品和粪便样品、来自 10 个养猪场的 143 份猪血清样品, 以及 3 批次进口食蟹猴共 100 份血清样品进行检测, 检出牛奶样品中副结核分枝杆菌阳性率为 7.7%, 牛粪样品中阳性率为 3.7%, 猪血清样品中阳性率为 8.2%, 进口猴血清样品中阳性率为 3.0%。

关键词: 副结核分枝杆菌, 荧光 PCR, 试剂盒, 动物感染调查

Development and Application of a Real Time PCR Detection Kit Specific for *Mycobacterium paratuberculosis*

CHEN Ru^{1*} LIU Zhong-Yong¹ GAO Xiao-Bo² LIU Zhi-Ling³ WU Xiao-Wei¹
ZENG Bi-Jian¹ LUO Chang-Bao¹ LIN Zhi-Xiong¹

(1. Guangdong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou, Guangdong 510635, China)

(2. Beijing LabX Corporation Ltd, Beijing 100085, China)

(3. South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: The real time PCR method based on TaqMan fluorescent DNA probe that specific for *Mycobacterium paratuberculosis* detection was established and developed into testing kit for rapid clinical diagnosis. The kit provided reagents for real time PCR and DNA extraction. The whole detection procedure included sample treatment and real time amplification could complete within 1 d. The testing kit could specifically identify 8 reference strains of *M. paratuberculosis* among various environmental existing microorganisms and 12 strains of other mycobacteria including *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. avium*. Tests on *M. paratu-*

基金项目: 国家质检总局科研项目(No. 2005IK126-8)

* 通讯作者: Tel: 86-20-38290659; Fax: 86-20-38290948; ✉ chenr@iqtc.cn; ychenr@sina.com

收稿日期: 2008-07-15; 接受日期: 2008-09-22

http://journals.im.ac.cn

berculosis culture samples and serial ten fold dilution of recombinant plasmid containing target template showed that, the assay could detect single bacterium and 15 copies of target gene, which was 100 fold increase of sensitivity than the gel-based PCR using primers of the same sequences. And the test on 20 mimic infected milk sample containing 50~100 bacteria of *M. paratuberculosis* all yielded positive results. The inter-assay CV% and intra-assay CV% of the kit was 1.41%, 2.42% respectively. We used the testing kit to investigate infection of *M. paratuberculosis* on domestic and imported animals. Nature samples including 250 fecal and milk samples from 7 cattle farms, 143 serum samples from 10 pig farms within Guangdong province, and 100 serum samples from three shipments of imported monkey, were collected and tested. The positive rate of *M. paratuberculosis* was 7.7% in cattle serum, 3.7% in cattle fecal, 8.2% in pig serum and 3.0% in monkey serum respectively.

Keywords: *M. paratuberculosis*, Real time PCR, Testing kits, Animal infection investigation

副结核病(Paratuberculosis, Johne's disease)是由副结核分枝杆菌(*Mycobacterium paratuberculosis*)引起的以牛、羊等反刍动物为主的一种消耗性、慢性肠炎,临床上以动物持续性腹泻和慢性消瘦为特征。该病呈全球性分布,主要感染家养或野生的反刍类动物,对奶牛业和肉牛业危害较大,受感染地区畜群的死亡率可达 2%~10%,由于难以根除,副结核病对养牛业造成的损失往往超过某些传染病^[1]。

副结核菌病被国际动物卫生组织(OIE)列为B类疫病,被我国列为二类动物性传染病,是我国进出境大中动物、皮张等动物性产品重点检疫的疫病之一。目前,国内外在进出境检疫以及疫病防控方面,常采用皮内变态反应、ELISA、补体结合试验、细菌分离培养等方法来进行副结核病诊断。这些方法在特异性、敏感性或检测周期等多方面均存在一定缺点,不能满足进出境检验检疫快速通关和疫病监测防控需求。建立准确快速的副结核诊断技术,对进出口动物及其产品检验检疫把关、食品安全监控以及提高畜牧业疫病防控和生产水平均有重要意义。实时荧光PCR作为一种快速高效的检测技术,已在人和动植物传染病诊断领域得到愈来愈广泛的应用。国外已开展荧光PCR方法检测副结核分枝杆菌的研究^[2,3],但国内目前还没有建立副结核分枝杆菌荧光PCR检测方法的报道。

本文应用 TaqMan 荧光标记探针技术原理,建立副结核分枝杆菌特异的实时荧光 PCR 快速检测鉴定方法,组装形成诊断试剂盒,并应用于对临床动物样品中副结核病原菌感染调查研究,详见如下。

1 材料与方法

1.1 菌株与核酸样品

副结核分枝杆菌 (*M. paratuberculosis*) 标准菌

株购自中国兽医与药品监督所,共 8 株,编号分别为 C68604、C68605、C68623、C68627、C68635、C68636、C68601、C68607、C68637; 灭活结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv(ATCC 27294)、禽分枝杆菌 (*M. avium*)标准菌株(ATCC 25291)、牛分枝杆菌 BCG 标准菌株来自广州市胸科医院;非结核分枝杆菌标准菌株龟、蟾、草、堪萨斯、胞内、耻垢、胃、瘰疬、偶然分枝杆菌来自广州市胸科医院。大肠杆菌 0:157、链霉菌、猪链球菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏杆菌、单增李斯特菌、致泻大肠埃希氏菌、阪崎肠杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、蜡样芽孢杆菌、衣原体等常见微生物核酸样品由本课题组保存。

1.2 试剂盒组成

含样品 DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.01% Triton X-100, 200 µg/µL 蛋白酶 K)、荧光 PCR 反应液(含探针、引物、镁离子、dNTP、UNG 酶)、Taq 酶、阳性对照和阴性对照。试剂盒由本课题组研制。置-20℃ 保存。

1.3 探针、引物设计与合成

采用 Primer Express 2.0 专业软件,设计 TaqMan 荧光 PCR 探针和引物。以副结核分枝杆菌特异的 IS900 插入序列(GenBank Accession No.:S74401)为扩增模板,扩增产物对应该序列 1057 bp~1203 bp 位点区域,探针对应应该序列 1086 bp~1108 bp 位点区域,探针 5' 端标记 FAM 荧光基团,3'端标记 BHQ-1。引物和探针均委托基康生物工程公司合成。

1.4 阳性克隆质粒

重组质粒 pEASE-900 由本课题组将扩增产物克隆到 pEASE-Blunt 平端载体上制备而成,经 PCR 和序列分析验证。

1.5 核酸提取方法

抗凝全血、血清、奶样的核酸纯化方法:取

1.2 mL 抗凝全血、血清或奶样, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。加等体积灭菌双蒸水洗 2 次(血清、奶样改为采用 0.01 mol/L pH 7.6 PBS 洗 1 次), 加 1 mL 灭菌 0.01 mol/L pH 7.6 PBS 洗 1 次, 均采用 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 加 30 μ L~50 μ L DNA 提取液, 56°C 温浴 30 min, 98°C 温浴 10 min; 加入等体积三氯甲烷处理 1 次后, 离心取上清, 直接用于 PCR 检测。粪样的核酸纯化方法: 取粪样 1 g~2 g, 按 1:5 的比例加入 4% 硫酸溶液(例 1 g 粪样, 加 5 mL 液体)振荡混匀, 37°C 温浴 0.5 h~1 h; 取中、上层较澄清液体 1.5 mL, 800 r/min 离心 1 min, 小心吸取上清; 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 加 1 mL 0.01 mol/L pH 7.6 PBS 洗 2 次, 均采用 10 000 r/min 离心 10 min; 加入 100 μ L DNA 提取液, 56°C 温浴 30 min, 98°C~100°C 温浴 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 加等体积三氯甲烷处理 1 次, 离心取上清, 加入等体积异丙醇沉淀核酸, 离心取沉淀, 用 70% 乙醇洗涤 1~2 次, 离心取沉淀, 加入 30 μ L~50 μ L 灭菌双蒸水溶解, 直接用于 PCR 或贮存于 -80°C 备用。

1.6 模拟阳性奶样

取 20 份阴性牛奶样品、每个样品取 1 mL, 每份添加相当于 50~100 个菌细胞的副结核分枝杆菌菌液, 振荡混匀后, 按步骤 1.5 提取分枝杆菌核酸, 进行荧光 PCR 检测试验。

1.7 荧光 PCR 反应体系及扩增反应条件

荧光 PCR 反应体系: 采用 30 μ L 反应体积, 反应液中含 0.2 mmol/L dNTP, 探针、引物各 0.2 μ mmol/L, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 1 U~2 U *Taq* DNA 聚合酶, UNG 酶 0.5 U, 3 μ L 模板。采用以下扩增循环反应条件: 第一阶段: 50°C 2 min, 95°C 4 min; 第二阶段: 95°C 10 s, 60°C 30 s, 40 个循环, 60°C 时设置采集荧光。报告荧光(Report Dye)设定为 FAM, 淬灭荧光(Quench Dye)设定为 None。本文中荧光 PCR 试验在 ABI 7500 荧光 PCR 仪上进行。

2 结果

2.1 副结核荧光 PCR 试剂盒特异性试验

采用副结核分枝杆菌荧光 PCR 试剂盒对副结核分枝杆菌标准菌株、适当稀释的阳性质粒模板, 其它各种分枝杆菌包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、禽分枝杆菌、龟分枝杆菌、蟾分枝杆菌、草分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、胞内分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、胃分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、偶然分枝杆菌, 以及大肠杆菌 O:157, 链霉菌、猪链球菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏杆菌、单增李斯特菌、致泻大肠埃希氏菌、阪崎肠杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、蜡样芽孢杆菌、衣原体等常见微生物核酸样品进行检测试验, 结果如图 1, 8 株副结核分枝杆菌标准菌株、阳性质粒模板均呈典型阳性反应, 其它样品均呈阴性反应。

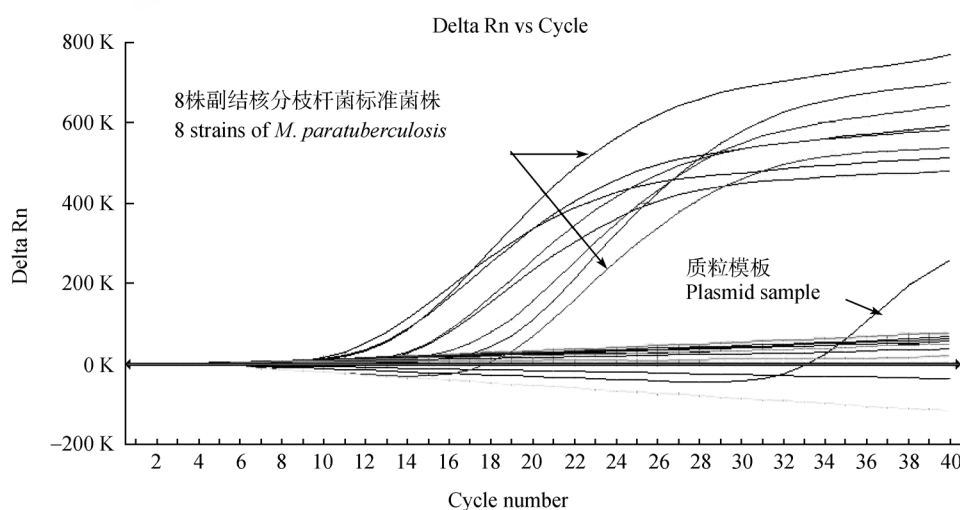


图 1 副结核荧光 PCR 试剂盒特异性检测试验

Fig. 1 Specific testing of the real time PCR detection kit for *M. paratuberculosis*

2.2 副结核荧光 PCR 试剂盒敏感性试验

以克隆了扩增序列的pEASE-900 重组质粒为模板进行试剂盒检测灵敏度(终点基因拷贝数)试验。采用质粒纯化试剂盒纯化阳性质粒pEASE-900, 测 OD_{260} 吸光度值, 根据公式: 质粒拷贝数/ μL = 总含量 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) / (质粒分子碱基数 $\times 10^{-15} \mu\text{g}$), 换算质粒单位体积对应的基因拷贝数。将质粒DNA采用无RNase, 无DNase水进行 10 倍系列稀释, 取各稀释度样品 3 μL , 进行副结核分枝杆菌荧光 PCR 检测试验。每

个稀释度均作两管重复检测。结果显示, 检测灵敏度可达 10^{10} 质粒稀释度, 相当于 15 个基因拷贝。图 2 显示稀释度为 $10^2 \sim 10^{11}$ 质粒模板的扩增曲线图。采用与荧光PCR相同序列的引物, 和与荧光PCR反应体系同样的 *Taq* DNA聚合酶对上述系列稀释的质粒模板样品进行常规PCR扩增和凝胶电泳检测, 结果表明, 常规PCR检测灵敏度可达 10^8 。即荧光PCR的检测灵敏度比常规PCR提高了 100 倍。

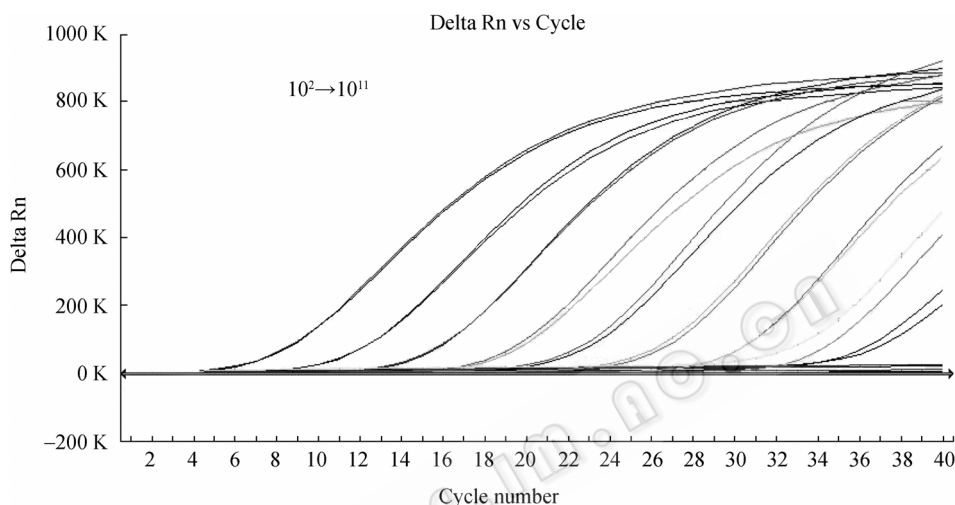


图 2 副结核荧光 PCR 试剂盒对阳性质粒模板检测敏感性试验

Fig. 2 Sensitivity testing of the *M. paratuberculosis* real time PCR kit on plasmid template

取编号为C68605 的灭活副结核分枝杆菌菌液 (含约 2×10^8 菌细胞/mL), 用灭菌双蒸水进行 10 倍系列稀释, 取各稀释度样品分别提取核酸后进行荧光PCR检测试验, 根据检测结果推算试剂盒检测菌细胞的灵敏度。结果显示, 10^9 稀释的菌液对应的核酸样品仍呈阳性反应, 表明荧光PCR的检测灵敏度可达每个反应 1 个菌细胞。

2.3 副结核荧光 PCR 试剂盒重复性和稳定性试验

2.3.1 试剂盒重复性试验: 采用副结核荧光 PCR 试剂盒, 对 2 份阳性样品分别进行 6 孔重复检测试验, 比较 Ct 值并计算 Ct 值变异系数(组内变异系数, inter-assay CV%), 同时, 对 1 份阳性样品进行 6 次检测试验, 比较 Ct 值并计算 Ct 值变异系数(组间变异系数, intra-assay CV%) 结果表明, 副结核荧光 PCR 试剂盒的组内变异系数为 1.41%, 组间变异系数为 2.42%。

2.3.2 试剂盒稳定性试验: 对副结核荧光 PCR 试剂

盒进行 3 个批次的检测试验, 各批次制备时间间隔 3 个月以上。对每个批次试剂盒均采用同样的阳性样品进行检测, 比较其 Ct 值差异。结果表明, 试剂盒的批间检测值变异系数(CV%)为 1.78%。试验表明, 试剂盒在 -20°C 保存 12 个月, 检测效果无明显差异。

2.4 对模拟阳性奶样的检测试验

对 20 份添加了 50~100 个菌细胞的牛奶样品进行检测试验, 结果均呈阳性反应, 荧光PCR反应C_T值为 31~33, 见图 3。

2.5 采用荧光 PCR 试剂盒对动物临床样品进行副结核分枝杆菌感染情况调查

从广东地区 7 个奶牛养殖场采集奶样、粪样, 从广东地区 10 个养猪场采集血样, 并抽取 3 批次进口食蟹猴血样, 采用副结核荧光 PCR 试剂盒进行检测试验, 以了解动物中副结核分枝杆菌感染情况, 所采集样品均来自表征健康动物。检测结果如表 1, 所有判为阳性反应的样品均从样品处理开始进行至少 2 次重复检测。

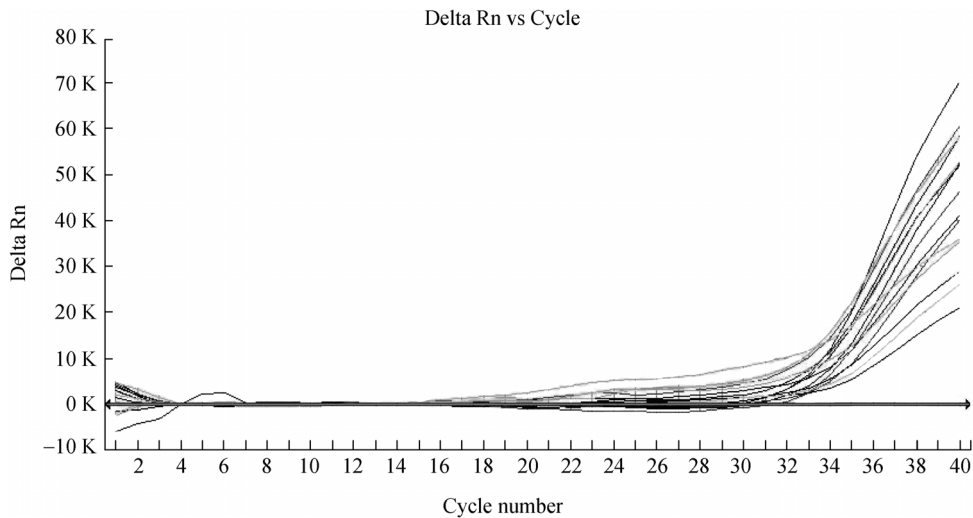


图 3 副结核分枝杆菌荧光 PCR 试剂盒对模拟阳性奶样的检测试验
Fig. 3 The test on mimic infected cattle milk samples by the *M. paratuberculosis* detection Kit

表 1 动物临床样品检测结果
Table 1 The detection of *M. paratuberculosis* infection on animal samples

| 动物种类 Species | 样品类别 Samples | 检测数量 Number of detection | 阳性数量 Positive num- bers | 阳性率(%) Positive rate |
|-----------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 牛 Cattle | 1 奶样 Milk | 168 | 13 | 7.7 |
| | 2 粪样 Fecal | 82 | 3 | 3.7 |
| | 合计 Total | 250 | 16 | 6.4 |
| 猪 Pig | 血清 Serum | 146 | 12 | 8.2 |
| 猴 Monkey | 血清 Serum | 100 | 3 | 3.0 |

3 讨论

本研究建立了副结核分枝杆菌特异的荧光 PCR 检测方法并形成试剂盒,检测试验表明,试剂盒特异性、敏感性、稳定性等技术指标均满足临床检测要求。试剂盒提供临床样品处理方法与核酸提取试剂,荧光 PCR 检测时间仅需约 1 h,检测全过程包括样品前处理可在 1 个工作日内完成,适合用于临床快速诊断。

副结核分枝杆菌与结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、牛分枝杆菌(*M. bovis*)、禽分枝杆菌(*M. avium*)以及动物体内或环境中广泛存在的多种非结核分枝杆菌均同属分枝杆菌属,它们结构和分子组成相似,应用核酸分子生物学技术原理建立菌种特异鉴定方法需要寻找特异的核酸序列。本研究选取副结核分

枝杆菌特异的 IS900 插入序列做为靶基因。IS900 插入序列常被作为副结核分枝杆菌的分子标记或 PCR 检测目标基因^[4]。检测试验表明,本研究所建立的荧光 PCR 试剂盒检测方法能特异鉴定副结核分枝杆菌,与结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、禽分枝杆菌无交叉反应。由于 IS900 在副结核分枝杆菌基因组中以多拷贝(多达 20 个拷贝)形式存在^[5],选其作为检测目标基因更能保障检测方法的敏感性。

据国外研究报道,副结核病原菌与人的一种慢性肠道疾病克罗恩氏病有关^[6]。患副结核病的奶牛常通过粪便和牛奶排放副结核分枝杆菌^[7,8]。一些研究揭示了商业性加工牛奶被副结核分枝杆菌污染的情况,国外学者针对动物性食品中副结核分枝杆菌的污染及食品加工技术对病原菌杀灭能力开展研究,证实当菌体含量较高时,牛奶经巴氏消毒后尚有副结核分枝杆菌存活^[9,10]。说明奶制品中副结核分枝杆菌污染应引起重视,应纳入奶制品食品安全监控范畴。本研究对模拟阳性奶样进行了检测试验,表明所研制的试剂盒能有效检测到奶样中副结核分枝杆菌的感染。

对广东地区 7 个奶牛场和 10 个养猪场的动物临床样品的检测结果表明,在国内养殖的奶牛和猪群中存在副结核分枝杆菌的感染。动物中副结核分枝杆菌的感染除影响动物健康,降低养殖生产效率,还可能干扰结核病皮试反应,造成假阳性,对此应引起重视。本研究对进口猴的检测亦发现有副结核分枝杆菌感染。目前,副结核病还没有被列入猴进

出境检疫项目, 本研究结果提示应关注进口猴中副结核检疫监控问题。

参 考 文 献

- [1] 于大海, 崔视林. 中国进出境动物检疫规范. 北京: 中国农业出版社, 1997, p.386.
- [2] Bögli-Stuber K, Kohler C, Seitert G, *et al.* Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. *J Appl Microbiol*, 2005, **99**(3): 587–597.
- [3] Tasara T, Stephan R. Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(10): 5957–5968.
- [4] Green EP, Tizard ML, Moss MT, *et al.* Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of mycobacterium paratuberculosis. *Nucl Acids Res*, 1989, **25**(17): 9063–9073.
- [5] Moss MT, Green EP, Tizard ML, *et al.* Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900. *Gut*, 1991, **32**: 3398–3995.
- [6] Gaya DR, Black RA, MacKenzie JF. Crohn's disease and MAP. *Lancet*, 2004, **18**(364): 2179.
- [7] Stabel JR, Wells SJ, Wagner BA. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *J Dairy Sci*, 2002, **85**: 525–531.
- [8] Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, *et al.* Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res*, 1995, **56**: 1322–1324.
- [9] Ellingson JL, Anderson JL, Koziezkowski JJ, *et al.* Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Pro*, 2005, **68**: 966–972.
- [10] Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cow's milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 2428–2435.

征订启事

《中国中医药现代远程教育》杂志征订征稿广告启事

《中国中医药现代远程教育》杂志是国家中医药管理局主管的国家级中医药科技期刊, 中国科技核心期刊, 中国科技期刊统计源期刊, 中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)中国期刊全文数据库(CAJED)及中国核心期刊《遴选》数据库, 中国期刊全文数据库收录期刊, 中国期刊网全文数据库收录期刊, 每月 8 日出版, 全彩印刷, 国内统一刊号 CN11-5024/R 国际刊号 ISSN1672—2779. 每册定价: 15 元, 全年 180 元。

《中国中医药现代远程教育》杂志服务于全国医药卫生及相关行业的科技人员, 是我国唯一传播中医药及中医药远程教育资讯的中医药科技期刊, 是中医药科教研发及大中专学生的教辅, 是中医药临床教研人员的益友, 也是中医药远程网络教育学员的教参。欢迎订阅, 全国邮局均可征订。国内邮发代号: 82—107, 国外代号 N-1751. 凡在当地订阅有困难者, 可直接与本刊发行部发行。广告许可证号: 京朝工商广字第 8091 号。欢迎刊登广告。

本刊主要栏目分四大版块: 一是临床版块: 临床专著 薪火传承 护理讲坛 临证精华 临床报道 他山之石。二是科研版块: 学术论著 实验研究 科研进展。三是远教版块: 中远论坛(教育与管理论坛) 远教辅导 试题解析 继教课堂 名师讲座 用药精讲。四是时政与文化版块: 特稿特讯 大医精诚 医海泛舟 杏林文苑 综合资讯。

来稿应精练、通顺、重点突出, 有新意。论著综述一般不超过 5000 字, (包括阅表、参考文献), 讲座/临床病理(例)讨论类文稿可视情况而定。论著摘要(简报)病理报告等 800~2000 字, 来稿请打印, 并附光盘或电子邮箱投稿。

来稿请寄:

地址: 北京市复兴门南大街甲 2 号配楼知医堂 101 室 邮编: 100031

在线投稿信箱: zyyjy2008@126.com zhongyuan@ichinamd.com

本刊官方网站: zhongyuan.itcmedu.com

联系电话: 010-51813289 010-51813298

传真: 010-51813296