

PCR 法对鸡卵黄中 *Coxiella burnetii* 菌的测定

乔莹^{1*} 蔡鑫泽¹ 赵连爽¹ 陈冬¹ 刘颖²

(1. 中国医科大学 附属第一医院中心实验室 辽宁 沈阳 110001)

(2. 沈阳军区第二零二医院综合内科 辽宁 沈阳 110003)

摘要: 【目的】通过用定量 PCR 加巢式 PCR 方法, 提高了对 *Coxiella burnetii* (*C. b*) *Com1* 基因的检出率; 通过对鸡卵中病原微生物 *Coxiella burnetii* 的基因检测, 明确鸡卵的食品安全性; 并对明确 *Coxiella burnetii* 的流行病学有重要意义。【方法】提取鸡卵 DNA, 用定量 PCR 加巢式 PCR 方法检测上述基因, 并对 PCR 产物进行测序分析, 通过间接免疫荧光法观察鸡血白细胞中的微生物。【结果】用定量 PCR 加巢式 PCR 方法可检出 4 个以上的 *Coxiella burnetii* *Com1* 基因, 用此方法可测出鸡卵中 *Coxiella burnetii* *Com1* 基因达 10^4 – 10^6 个, 阳性率为 5%–22%; 对阳性鸡卵 *Com1* 基因 PCR 产物的测序结果显示有变异菌株的存在; 免疫荧光法可见鸡卵中含有该微生物。【结论】由此认为鸡卵中存在病原微生物 *Coxiella burnetii*, 可能是 Q 热传染源。

关键词: *Coxiella burnetii*, 定量 PCR, 巢式 PCR, 鸡卵

Determination of *Coxiella burnetii* in egg yolk by PCR method

QIAO Ying^{1*} CAI Xin-Ze¹ ZHAO Lian-Shuang¹ CHEN Dong¹ LIU Ying²

(1. The First Affiliated Hospital of China Medical University, Central Laboratory, Shenyang, Liaoning, 110001, China)

(2. The No. 202 Hospital of Shenyang Military District, General Medicine, Shenyang, Liaoning, 110003, China)

Abstract: [Objective] Improve the detection rate of *Coxiella burnetii* (*C. b*) *Com1* gene by quantitative PCR and nested PCR; determine the food safety of egg yolk by *Coxiella burnetii*

基金项目: 辽宁省教育基金项目(No. 2008S238); 教育部留学归国启动基金项目[教外司 2009(8)]

*通讯作者: Tel: 86-24-83282728; 信箱: QFM1932@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-10-24; 接受日期: 2012-01-10

Com1 gene detection, which has great magnificence for *Coxiella burnetii* epidemiology. [Methods] Extract DNA in chicken eggs, determine the *Com1* gene by quantitative PCR and nested PCR, and sequence the PCR products. Observe the microorganism in chicken blood leukocytes by indirect immunofluorescence. [Results] Results showed that over 4 *Com1* genes were detected by quantitative PCR and nested PCR, and the amount of *Com1* genes in chicken eggs reached 10^4 – 10^6 with the positive rate of 5%–22%. The sequencing results of PCR products showed that there were variant strains in positive chicken eggs. Immunofluorescence observed the microorganism *Coxiella burnetii* in chicken eggs. [Conclusion] Therefore we draw the conclusion that the microorganism *Coxiella burnetii* exists in chicken eggs and it may be the source of infection of Q fever.

Keywords: *Coxiella burnetii*, Quantitative PCR, Nested PCR, Chicken egg

Coxiella burnetii (*C. b*)俗称 Q 热立克次体,也称贝氏柯克斯体,是细胞内生短小杆菌(图 1),其在酸性条件下代谢旺盛、在细胞浆的 Endosome 内繁殖,形成内封入体。*C. b* 是 Q 热的病原菌, Q 热是分布最广的人兽共患传染病之一^[1-2]。由于 Q 热在临床上无特异症状和体征,因而与其他热性传染病难以鉴别,误诊率极高,应引起足够重视。

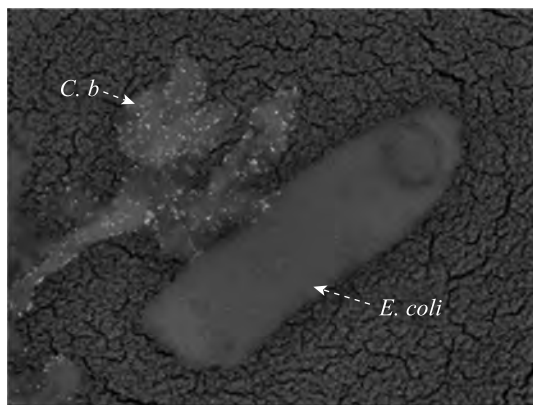


图 1 *Coxiella burnetii* 与大肠菌电子扫描显微镜图像 (5 000×)

Fig. 1 Scanning electron microscopic image of *Coxiella burnetii* and *Escherichia coli* (5 000×)

注: *C. b* 菌表面被胶体金标识 *Com1* 特异性抗体标记; 大肠菌未被标记。大肠菌大小在 $2\ \mu\text{m}\times 0.3\ \mu\text{m}$, 而 *C. b* 在 $0.8\ \mu\text{m}\times 0.1\ \mu\text{m}$ 左右, 大肠菌是 *C. b* 的 10 倍左右。

Note: *Coxiella burnetii* was labeled with colloidal gold, which was coupled with *Com1* antibody. The size of *C. b* was $0.8\ \mu\text{m}\times 0.1\ \mu\text{m}$, and *E. coli* was $2\ \mu\text{m}\times 0.3\ \mu\text{m}$. So *E. coli* was 10 times *C. b*.

Q 热分为急性 Q 热和慢性 Q 热。急性 Q 热多有报道, 慢性 Q 热死亡率高难以治愈。鉴于 Q 热患者的临床表现多种多样, 一般以发热、咳嗽、头痛、肌肉酸痛为主要症状, 并常伴有肺炎、肝炎、心内膜炎、大动脉瘤等, 与其他立克次体病的不同之处是无皮疹及外斐氏反应阴性。在缺乏实验室检查和流行病学资料分析往往未被重视的情况下, Q 热的误诊和漏诊相当严重。世界范围内 Q 热的发病率呈上升趋势, 感染途径不明的病例增多, 有报道称与宠物增多呈正相关, 我们从食品安全的角度, 验证鸡蛋是否是潜在的 Q 热传染源之一^[3-5]。

1 材料与方法

1.1 *Coxiella burnetii* (*C. b*) 菌 PCR 标准品及阳性对照

Coxiella burnetii genome DNA 来源于 Nine Mill II 相菌, 用引物 OPM1: (5'-AGTAGAAGCAT CCCAAGCATTG-3')和 OPM4: (5'-TTGGAAGTT ATCACGCAGTTG-3'), 进行 PCR 反应: $95\ ^\circ\text{C}$ 30 s; $95\ ^\circ\text{C}$ 5 s, $55\ ^\circ\text{C}$ 30 s, $72\ ^\circ\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环。应得到 27 kD 外膜蛋白 *Com1* 基因的 501 bp 的 DNA 片段。用胶 DNA 回收试剂盒 (TaKaRa) 回收 501 bp DNA 片段后, 测定 DNA 浓度, 系列稀释作为标准品用于定量 PCR 反应。

1.2 主要仪器

PCR 及巢式 PCR 反应使用 ABI GeneAmp PCR system9700; 定量 PCR 使用 Corbett, 测序仪使用 ABI3130 Genetic Analyzer, 荧光显微镜使用 NIKON。

1.3 试剂

(1) PBST (g/L): NaCl 8, Na₂HPO₄ 2.89, KCl 0.2, KH₂PO₄ 0.2, Tween-20 1 mL。

(2) 洗净液: 10 mmol/L Tris 缓冲液 (pH 7.2) 含有 0.5% NP-40, 0.25% Tween-20。

1.4 实验方法

1.4.1 鸡卵总 DNA 提取方法: 先取约 1/9 鸡卵黄, 用 40 mL PBST 稀释后、用 2 000 r/min 离心 30 min 去沉淀, 取上清再用 10 000 r/min 高速离心 30 min 后取沉淀, 沉淀用洗净液 2 mL 洗净离心 2 次, 将沉淀放入-80 °C 冰箱冷冻 20 min, 解冻反复操作 3 次后, 用含有 50 mg/L 蛋白消化酶 K 的裂解液(Promega, E397A) 200 µL, 56 °C 2 h 消化处理后^[6], 用磁珠法提取 DNA (TOYOBO, NPK-501)。

1.4.2 定量 PCR 测定: 引物 OPM1 (5'-AGTAGA AGCATCCCAAGCATTG-3')和 OPM3 (5'-GAAG CGCAACAAGAAGAACAC-3'), 应得到 27 kD 外膜蛋白 *Com1* 基因的 472 bp 的 DNA 片段。将上述鸡卵总 DNA 提取物的 1/30 (2 µL), 按照 TaKaRa SYBR Premix Ex *Taq*TM II 试剂盒说明书操作, PCR 反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。2%琼脂糖电泳后, 确认产物为 472 bp 的片段^[7]。

1.4.3 巢式 PCR: 引物 OPM2 (5'-TGCCTGCTA GCTGTAACGATTG-3')和 OPM3 (5'-GAAGCGC AACAAGAAGAAGAACAC-3'), 应得到 27 kD 外膜蛋白 *Com1* 基因的 438 bp 的 DNA 片段。100 µL 体

系含有: 10×反应缓冲液 10 µL、2.5 mmol/L dNTPs 8 µL、25 mmol/L MgCl₂ 12 µL、每种引物为 80 mmol/L 0.8 µL、*Taq* 酶 0.4 µL, 定量 PCR 反应产物 2 µL, 用纯净水加到 100 µL。反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环。2%琼脂糖电泳后, 确认产物 438 bp 片段^[8]。

1.4.4 PCR 产物测序: 用 2%琼脂糖电泳后, 切胶回收 DNA 片段, 精制试剂盒精制 PCR DNA 片段产物, 以 OPM2 为引物用直接测序法测定精制 PCR DNA 片段产物^[9]。

1.4.5 鸡血球免疫荧光染色: 用肝素抗凝抽取鸡血涂片并固定, 用抗 *C. b* Com1 表面蛋白单克隆抗体稀释 2 000 倍作为一抗染色 37 °C、2 h 洗净后, 再用兔抗鼠荧光标识抗体稀释 5 000 倍做为二抗染色后洗净, 用光学及荧光显微镜照相。

2 结果

2.1 定量 PCR 加巢式 PCR 法测定 *C. b* 菌基因的感受度

用 OPM1 和 OPM3 作为 *C. b* 定量 PCR 反应引物, 用 *C. b* 菌 PCR 标准品作为模板, 标准曲线 R^2 达到 0.999。用 OPM1 和 OPM3 作为引物进行定量 PCR 反应, 反应产物为 472 bp 长度的 DNA 片段, 可测出大约 40 个 *C. b* 基因片段; 在定量 PCR 的基础上, 用 OPM2 和 OPM3 进行巢式 PCR 反应, 反应产物为 438 bp 长度的 DNA 片段, 可以在定量 PCR 的感受度基础上增加 10 倍, 可测出大约 4 个 *C. b* 基因。

2.2 实际鸡卵的 *C. b* 菌 DNA 含量

图 2 为实际从鸡卵中提取总 DNA, 进行定量 PCR 反应的部分电泳图。可见 29、66、125、169、150、164 号鸡卵为阳性, 特异片段长度为 472 bp。

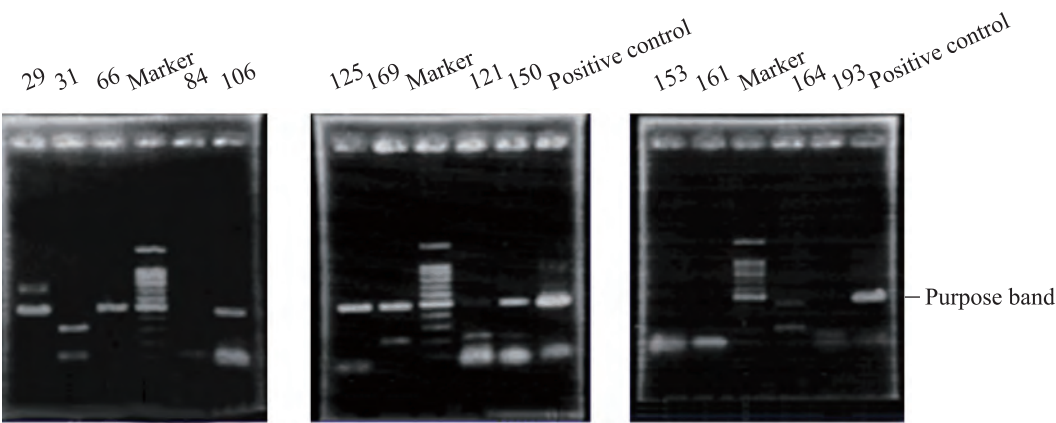


图 2 鸡卵黄中 *C. b Com1* 的 PCR 结果
Fig. 2 PCR results of *C. b Com1* in egg yolk

注: 将卵黄中 *C. b Com1* 的 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 其中 29、66、125、169、150、164 号鸡卵为阳性。
Note: The PCR products of *C. b Com1* in egg yolk were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. Number 29, 66, 125, 169, 150 and 164 were positive.

定量 PCR 测定鸡卵可能保有的 *C. b* 菌量(表 1), 推算一个鸡卵黄中可能含有的 *C. b* 分子数, 从 10^4 到 10^6 不等。它们中有 2 个 PCR 片段测序失败, 其余 6 个片段测序皆为 *C. b Com1* 基因的一部分, 其中 150 号基因有变异(表 2)。

2.3 鸡卵 *C. b* 菌 DNA 片段的测序及突变位点的确定

用上游及下游引物同时测序定量 PCR 472 bp 片段, 鸡卵黄 DNA *Com1* 基因 PCR 产物测序结果中, 与 *Nine mile* 菌株同部位基因相比的突变位点。表 2 中表示的突变位点是分别用上游引物与下游引物直接测序后, 同时发生变异的位点, 同时该位点没有其他可疑碱基峰出现。带下划线的碱基字母表示与 *Nine mile* 菌株同位点有变异; 带下划线的氨基酸表示突变氨基酸。与 *Nine mile* 菌的 *Com1* 基因相比, 有 12 个鸡卵 *C. b Com1* 基因有突变出现, 其中 8 个引起氨基酸突变, 4 个突变为氨基酸静止性突变。有 4 个鸡卵呈现 2 个以上的突变位点, 1 个鸡卵中最多可测到 4 个突变位点, 有 2 个氨基酸突变(表 2)。

表 1 鸡卵黄定量 PCR 的结果
Table 1 Quantitative PCR results of egg yolk

标本号 Sample number	定量 PCR 结果 Quantitative PCR results	测序 Sequencing	
	<i>C. b Com1</i> gene 分子数 Number of <i>Com1</i> molecules	片段确认 Identification	
29	$386^a \times 30^b \times 9^c = 104\ 220^d$	+	+
66	$38^a \times 30^b \times 9^c = 10\ 260^d$	+	+
106	$8181^a \times 30^b \times 9^c = 2\ 208\ 870^d$	+	+
121	$235^a \times 30^b \times 9^c = 63\ 450^d$	+	NT ¹⁾
125	$153^a \times 30^b \times 9^c = 41\ 310^d$	+	+
150	$268^a \times 30^b \times 9^c = 72\ 360^d$	+	+
164	$109^a \times 30^b \times 9^c = 29\ 430^d$	+	NT
169	$122^a \times 30^b \times 9^c = 32\ 940^d$	+	+

注: NT: 测序失败。^a: 由标准曲线自动算出数值; ^b: 部分鸡卵黄提取总 DNA 量的 1/30 作为 PCR 的模板使用; ^c: 使用 1/9 卵黄提取总 DNA; ^d: 一个鸡卵含的 *C. b Com1* gene DNA 的分子数。
Note: NT: Failure of sequencing. ^a: Automatically calculated by standard curve; ^b: 1/30 of the total amount of DNA in egg yolk was used as PCR template; ^c: 1/9 of egg yolk was used for DNA extraction; ^d: The number of *C. b Com1* molecules in one chicken egg.

表 2 鸡卵黄 *C. b Com1* 472bp 片段中的突变位点
Table 2 Mutational site of *C. b Com1* in egg yolk

AA of <i>Nine mile</i>	97	103	109	110	127	131	136	137	142	151	155	163	164	156	173	175	177
	GGC	ACA	TGT	AAT	ACA	GTT	CTG	CCC	CAA	TTA	AAA	CAC	GAC	CTG	GAC	GAA	ATC
	Gly	Thr	Cys	Asn	Lys	Val	Leu	Pro	Gln	Leu	Lys	His	Asp	Leu	Asp	Glu	Ile
	GGT		CGT														
156	Gly		Arg														
		GCA			AGA												
169		Ala			Arg												
				AAC													
284				Asn													
					AGA												
190					Arg												
						GTC											
119					Val												
							CAG										
126							Gln										
								CCT									
162								Pro									
									CGA								
127									Leu								
										CTA				CCG			
112										Leu				Pro			
											AAT						
150											Lys						
												CAT	AAC		AAC	GAC	
30												His	Asn		Asn	Glu	
																	AAC
175																	Asn

2.4 鸡血涂片间接特异性抗体免疫荧光染色

光学显微镜下可见鸡红血球为有核均匀椭圆形，白血球为不规整形有核；荧光显微镜下可见同一图像的白血球内有多数密集的荧光颗粒存在，确认为 *C. b* 内封入体(图 3)。

3 讨论

我们用定量 PCR 加上巢式 PCR 法可以使 PCR 反应感度增加 10 倍左右，用一般 PCR 反应

产生 501 bp 片段产物，通过胶回收法回收该片段，定量 DNA 浓度，以 10 倍系列稀释该 DNA 产物并作为模板，用上述定量 PCR 加巢式 PCR 法反应，定量 PCR 反应阶段可测出 40 个 *Com1* 基因^[10]，加上巢式 PCR 反应最多可测出 4 个 *Com1* 基因片段。理论上，如果 *C. b* 的整个基因只含有一个 PCR 特异性反应位点，并且整个基因做为底物与 PCR 产物做为底物的 PCR 反应差异可以忽略，那么用定量 PCR 加巢式 PCR 反应可以测出 4

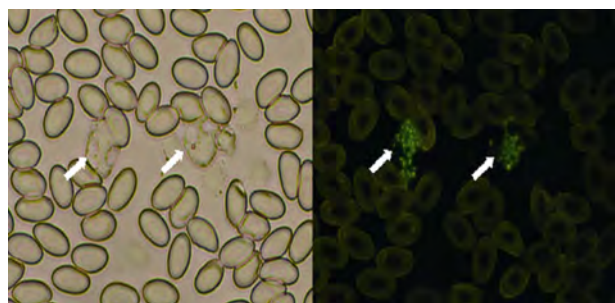


图3 鸡血球的光镜和免疫荧光图像

Fig. 3 The light microscopy and immunofluorescence images of chicken blood cells

注: 光学显微镜下可见鸡红细胞为有核椭圆形, 白细胞为有核不规则形; 同一部位的荧光显微镜下可见均一大小的细小荧光颗粒, 为 *C. b* 的内封入体。

Note: In the light microscopy chicken red blood cells were observed nuclear elliptic ones and white blood cells were nuclear irregular ones. In the same position immunofluorescence shows that there were tiny fluorescent particles of the uniform size, i.e. inclusion body.

个 *C. b* 菌的存在。实际上我们用上述定量 PCR 法, 应用于鸡卵中, 仅测出 10^4 左右的 *C. b* 菌。敏感度降低了数百倍, 可能是由于鸡卵中提取的 DNA 杂质较多, 并且卵黄中的高蛋白高卵磷脂可能是影响 PCR 反应的主要原因。

用定量 PCR 反应测定鸡卵中的 *C. b* 菌 *Com1* 基因数量, 在标准品的选用上, 我们没能直接用 *C. b* 基因做为标准品, 是由于 *C. b* 是细胞内菌, 没有准确的定量方法, 同时整体基因达 2 000 kb 左右, 计数误差大, 不准确。用 501 bp PCR 反应产物为标准品, 反应体系标准曲线 R^2 高达 99.99, 曲线完美。我们用此方法推测一个鸡卵中的 *C. b* 菌基因数可达到 10^6 左右。我国也对 *C. b* 的检测做了大量的工作, 亚红祥等^[11]通过 TaqMan 实时定量 PCR 法对 IS1111a 基因检测可以检出 10 个基因数左右, 并且他们用 IS1111a 基因片段(485 bp)克隆质粒 DNA 模板作为标准品, 相对于我们用 PCR 产物作为标准品来说, 更具有说服力, 为今后标准品的改进提供了方法学依据。我们分别测定了 *Com1* 基因的 PCR 反应产物的序

列, 发现有突变菌株。从 *Com1* 的 97 号到 177 号共 80 个氨基酸序列中, 有 8 个鸡卵的 *C. b Com1* 基因发生变异, 14 个发生基因变异。我们选定变异菌株的条件是, 一定用 Forward 及 Reverse 双侧引物分别测序并予以重复实验, 在同一位点发生同样变异的序列定为变异菌株, 变异菌株也反证了鸡卵中 *C. b* 菌存在的真实性; 我们也对 *C. b* 阳性鸡卵进行浓缩后, 对免疫缺陷 (SCID) 鼠进行了动物实验, 鼠脏器免疫组织化学染色结果表明为阳性(结果待发表), 因此, 我们确信本研究结果的真实性。

为了佐证鸡可以感染 *C. b*, 我们提取鸡身上的寄生虫、鸡螨虫等 30 个抽提 DNA 并进行 PCR 测定发现, *C. b* PCR 阳性的占 50% 左右(结果未显示)。我们对鸡血涂片进行了大量的荧光染色测定, 发现鸡白细胞中可以感染 *C. b* 菌, 并能增殖。*C. b* 菌在单核细胞或巨噬细胞内繁殖, 鸡白细胞内确认到 *C. b* 菌证明 *C. b* 菌可以感染鸡, 由于其寄生生物提取 DNA *C. b Com1* 基因 PCR 反应阳性, 因此通过螨虫感染传播的可能性极大。以前有报道在鸡卵黄中可以分离到幽门螺菌, 并证明有致病性, 因此, 我们推测鸡卵中的 *C. b* 菌也应该具有感染性。而最终能否从鸡卵中分离并培养出有生物活性的 *C. b* 菌是确定鸡卵是否是 *C. b* 菌感染源之一的唯一必要条件, 鉴于 *C. b* 菌是细胞内菌, 培养困难, 还需要进一步的研究^[12-14]。

参 考 文 献

- [1] Horigan MW, Bell MM, Pollard TR, et al. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2011, 23(5): 924-931.
- [2] Sunder S, Gras G, Bastides F, et al. Chronic Q fever: relevance of serology[J]. Clinical Infectious Diseases, 2011, 53(7): 749-750.

- [3] Kowalczywska M, Sekeyová Z, Raoult D. Proteomics paves the way for Q fever diagnostics[J]. *Genome Medicine*, 2011, 3(7): 50.
- [4] Courcoul A, Monod H, Nielen M, et al. Modelling the effect of heterogeneity of shedding on the within herd *Coxiella burnetii* spread and identification of key parameters by sensitivity analysis[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2011, 284(1): 130–141.
- [5] Skultety L, Hajdúch M, Flores-Ramírez G, et al. Proteomic comparison of virulent phase I and avirulent phase II of *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever[J]. *Journal of Proteomics*, 2011, 74(10): 1974–1984.
- [6] Hirai A, Kaneko S, Nakama A, et al. Investigation of *Coxiella burnetii* contamination in commercial milk and PCR method for the detection of *C. burnetii* in egg[J]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2005, 46(3): 86–92.
- [7] Kato K, Arashima Y, Asai S, et al. Detection of *Coxiella burnetii* specific DNA in blood samples from Japanese patients with chronic nonspecific symptoms by nested polymerase chain reaction[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1998, 21(2): 139–144.
- [8] Hou MY, Hung MN, Lin PS, et al. Use of a single-tube nested real-time PCR assay to facilitate the early diagnosis of acute Q fever[J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2011, 64(2): 161–162.
- [9] Heinzen RA, Frazier ME, Mallavia LP. *Coxiella burnetii* superoxide dismutase gene: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*[J]. *Infection and Immunity*, 1992, 60(9): 3814–3823.
- [10] van Nguyen S, Hirai K. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 180(2): 249–254.
- [11] 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): 345–350.
- [12] Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MWJ, et al. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever[J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(12): 5640–5650.
- [13] Field PR, Mitchell JL, Santiago A, et al. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with immunofluorescence and complement fixation tests for detection of *Coxiella burnetii* (Q fever) immunoglobulin M[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(4): 1645–1647.
- [14] Heinzen RA, Frazier ME, Mallavia LP. Nucleotide sequence of *Coxiella burnetii* superoxide dismutase[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(21): 6437.