

实时荧光定量 TaqMan-MGB 探针法检测杆菌样巴尔通体

栗冬梅^{1Δ*} 刘云彦^{1,2Δ} 杜鹏程¹ 宋秀平¹ 刘起勇^{1*}

(1. 中国疾病预防控制中心 传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 北京 102206)

(2. 山东大学 生命科学院 山东 济南 250100)

摘要: 【目的】应用 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 技术建立特异性强、敏感性高和稳定性好的快速杆菌样巴尔通体检测方法。【方法】应用生物信息学方法查找杆菌样巴尔通体特有基因, 从中筛选出一段特有的基因序列为模板设计探针和引物。通过比较 C_t 值和荧光强度确定扩增反应的最佳退火温度、探针和引物浓度; 将扩增产物连接到 pEASY-T 载体上制备标准品, 绘制标准曲线, 分析扩增效率和线性关系; 评估方法的特异性、敏感性及重复性。【结果】优化后退火温度为 60 °C, 探针和引物浓度均为 200 nmol/L, 反应体系 20 μ L。特异性实验显示只有杆菌样巴尔通体扩增出荧光信号, 其他种属细菌均未见荧光信号; 标准曲线线性关系良好($R^2=1$), 扩增效率 $E=98.18\%$; 最低检出限为每个 PCR 反应 3 个拷贝; 组内和组间的变异系数 CV 值分别为 0.21%–0.42%和 0.29%–0.59%, 在允许范围内。【结论】研究建立的实时荧光定量 TaqMan-MGB 探针法特异性强、灵敏度高、稳定性好, 可快速检测鉴定杆菌样巴尔通体, 为这种巴尔通体所引起的一系列疾病的早期快速诊断、监测和流行病学调查等研究提供有效手段。

关键词: 杆菌样巴尔通体, 卡瑞恩病, 实时荧光定量 PCR, TaqMan 探针, 生物信息学

Detection of *Bartonella bacilliformis* by real-time PCR with TaqMan-MGB probe

LI Dong-Mei^{1Δ*} LIU Yun-Yan^{1,2Δ} DU Peng-Cheng¹ SONG Xiu-Ping¹ LIU Qi-Yong^{1*}

(1. State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

(2. School of Life Sciences, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: [Objective] *Bartonella bacilliformis* is a fastidious haemotropic gram-negative bacterium, an etiological agent of a life-threatening illness, termed Carrion's disease or bartonellosis. We developed a rapid, highly sensitive and specific assay, based on real-time fluorescence quantitative PCR for identifying *B. bacilliformis*. [Methods] A primer pair and probe set for *B. bacilliformis* were

基金项目: 十二五重大专项课题项目(No. 2013ZX10004-101, 2012ZX10004219-002)

*通讯作者: 栗冬梅: Tel: 86-10-58900738; 信箱: lidongmei@icdc.cn

刘起勇: Tel: 86-10-58900741; Fax: 86-10-58900739; 信箱: liuqiyong@icdc.cn

Δ共同第一作者

收稿日期: 2014-06-15; 接受日期: 2014-08-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-08-25

designed based on a species-specific gene of *B. bacilliformis*, based on bioinformatics method by scanning and comparing of all bacteria on GenBank data. The annealing temperature and the final concentration of the TaqMan probe and primers were optimized. The amplification product of the target gene was cloned into pEASY-T vector for preparing the standard and making a standard curve. The standard curve was made using 10×dilution series of the reference plasmid and the efficiency and linearity of PCR amplification were analyzed. Specificity, sensitivity and reproducibility of the PCR system were assessed. **[Results]** The optimized annealing temperature is 60 °C and the probe and primer concentration are 200 nmol/L for 20 µL reaction system. The TaqMan probe-based fluorescence quantitative PCR did not show cross reactivity with other *Bartonella* species, non-*Bartonella* bacteria and the other animals. The correlation coefficient R^2 and *E*-value of the standard curve were 1.0 and 98.18%, respectively. **[Conclusion]** The real-time PCR with TaqMan-MGB probe assay is highly specific and sensitive for the detection of *B. bacilliformis*.

Keywords: *Bartonella bacilliformis*, Carrion's disease, Real-time fluorescence quantitative PCR, TaqMan probe, Bioinformatics

早在 1905 年, 秘鲁的微生物学家艾尔伯特·巴顿(Alberto Barton)在红细胞中发现了人类巴尔通体病(Bartonellosis)的致病因子——杆菌样巴尔通体(*B. bacilliformis*, Bb)。1919 年, 泰勒马克·巴蒂斯梯尼(Telémaco S. Battistini)和野口英世(Hideyo Noguchi)分离出该病原体, 为了纪念巴顿医生首次发现这种微生物, 将其命名为 Bb^[1]。Bb 为单端多鞭毛的杆状或球杆状多形性需氧杆菌, 不产生芽孢, 寄生于人血管内皮细胞或红细胞内, 基因组大小为 1.45 Mb, G+C mol% 为 38.2%。Bb 引起的疾病又称为卡瑞恩病(Carrion's disease), 急性期为奥罗亚热(Oroya fever), 慢性期为秘鲁疣(Verruga Peruana 或 Peruvian Wart)^[2-4], 主要分布在秘鲁、哥伦比亚和厄瓜多尔等南美安第斯山脉地区, 人是唯一的宿主, 通过白蛉(*Lutzomyia verrucarum*)传播^[5]。传播媒介白蛉只栖息于安第斯山麓的丘陵地区, 这一地区是秘鲁疣的疫区, 该区域被称为“疣症地带(Verruga zone)”, 因此, 卡瑞恩病受到传播媒介地理分布的限制, 为一种地方性流行病^[6]。

目前, 对此菌检测方法主要是分离培养、血清学检测和常规 PCR 检测。Bb 生长缓慢、营养条件要求苛刻而难于分离培养, 一般应用胰酶大豆琼脂培养基、哥伦比亚培养基或脑心浸液血琼脂中加入 5%–10% 的兔血、羊血或马血(脱纤维抗凝), 在湿润条件下, 25–37 °C 培养 7–14 d, 甚至更长时间, 可

长成针尖状或直径毫米以下的半透明灰白菌落, 生化反应不活泼, 没有特征性, 不能用于菌种鉴定。血清学检测通常用 IFA 法和 ELISA 法^[7]检测巴尔通体抗体, 有些种如汉赛巴尔通体(*B. henselae*, Bh)和五日热巴尔通体(*B. quintana*, Bq)有市售的检测试剂盒, 对于 Bb 国外仅有个别实验室能够进行, 该方法在判读结果时有一定的主观性, 灵敏度和特异性均不高^[8-10]。常规 PCR 检测虽然避免了上述两类方法的缺陷, 但存在引物结合缺乏特异性、实验室污染和临床样品中 PCR 抑制物存在造成假阴性等, 限制了在临床诊断中的推广应用。探针法实时荧光 PCR 方法依据序列特异性探针区别物种, 增加了实验特异性和灵敏度, 能够很好地解决上述问题, 在传染病病原检测上日渐普及。

Bb 引起的疾病严重影响人类健康, 急性期病死率较高, 慢性期可造成毁容, 给病人带来身心痛苦, 造成严重的疾病经济负担。近年来, 我国与南美洲国家交往日益加深, 贸易往来及工程合作方兴未艾, 加之国内赴南美旅游不断升温, 使得我国此病的高危人群不断增加, 输入病例的可能性越来越大。因此, 有必要建立一种特异性强、灵敏度高和稳定性好的方法, 能够快速准确地检测 Bb, 以辅助临床实验室诊断、相关疾病监测和口岸检疫。目前, 国外虽有应用实时荧光定量 PCR 方法检测干血滤纸片(Dried blood spots, DBS)样品中 Bb 的报道, 但

没有对该方法做详细评估数据^[11]。本研究首先应用生物信息学方法筛选 Bb 特异基因, 并以此设计特异引物和探针, 利用 TaqMan 探针技术建立了一种灵敏度高、特异性强和稳定性好的快速检测鉴定此菌的实时荧光定量 PCR 方法。

1 材料与方法

1.1 菌株和生物样品 DNA

巴尔通体基因组 DNA 包括 Bb 标准菌株 ATCC 35685、文森巴尔通体博格霍夫亚种(*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, Bvb) ATCC51672、Bh ATCC49882、Bq ATCCVR-358、克氏巴尔通体(*B. clarridgeiae*, Bc) ATCC51734、克勒巴尔通体(*B. koehlerae*, Bk) ATCC700693、文森巴尔通体阿鲁潘亚种(*B. vinsonii* subsp. *arupensis*, Bva) ATCC700727、文森巴尔通体文森亚种(*B. vinsonii* subsp. *vinsonii*, Bvv) ATCCVR-152、伊丽莎白巴尔通体(*B. elizabethae*, Be) ATCC49927、格拉汉姆巴尔通体(*B. grahamii*, Bg) ATCC700132、道志巴尔通体(*B. doshiae*, Bd) ATCC700133 和特利波契巴尔通体(*B. tribocorum*, Bt) CIP 105476; 根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)以及人、猫、犬、兔、羊、鼠、刺猬和蜉蝣基因组 DNA 均为中国疾病预防控制中心传染病预防控制所媒介生物控制室保存。

其他细菌基因组 DNA 包括脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、肺炎克雷白杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、普氏立克次体(*Rickettsia prowazekii*)、马赛立克次体(*R. massilliae*)、日本立克次体(*R. japonica*)、嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)、鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis* EV76)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、金

黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)和伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)均为中国疾病预防控制中心传染病预防控制所有关科室提供。

1.2 主要仪器设备与试剂

荧光定量 PCR 仪, CFX96, Bio-Rad 公司; 台式高速离心机, 5804R, Eppendorf 公司; 微量核酸浓度测定仪, NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific 公司。

核酸提取和常规 PCR 扩增试剂为 QIAamp DNA Mini Kit 和 Fast Cycling PCR Kit, 购自 QIAGEN 公司; 克隆试剂为 pEASY-T1 Cloning Kit, 购自北京全式金生物技术有限公司; 荧光定量 PCR 试剂为 GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix, 购自 Promega 公司; 质粒提取试剂购自北京擎科新业生物技术有限公司。探针和引物由上海基康生物技术有限公司合成。

1.3 靶基因筛选、TaqMan 探针与引物的设计

根据 Bb 基因和其他细菌基因组的相似度进行筛选得到检测靶标候选基因位点。使用序列局部比对工具(Basic local alignment search tool, BLAST), 将 Bb 的 KC583 株(GenBank 数据库序列号: NC_008783)的全部 1 283 个基因和已有的其他所有细菌全基因组序列进行比对。细菌全基因组数据来自于美国国立生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 GenBank 数据库(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/genomes/Bacteria>), 共包含 1 898 个细菌全基因组。使用 BLAST 软件中的核酸比对程序 BLASTn 进行序列比对, 期望值(e)设置为 1e-5。对比对结果进行进一步分析和筛选, 若 KC583 株某基因与其他任何细菌基因的比对长度在基因全长 50%以上、相似度在 75%以上, 则认为该基因与其他细菌相似度较高, 不适合作为 Bb 的特异基因。KC583 株的 1 283 个基因中共 924 个基因和其他细菌基因相似度较高, 共筛选得到 359 个基因作为 Bb 检测靶标的候选基因库供进一步筛选和验证。

从上述靶标候选基因库中选择 Bb 一特有未知功能的基因(BARBAKC583_1366)为目标序列, 采用 ABI Primer Express 2.0 软件设计探针和引物, 上游引物 Bb2F (5'-CAATTATCATCATTATTTGCTCCTGG-3')、下游引物 Bb2R (5'-TACTGCTGAGGTTGGGCGA-3')和探针 BbT (FAM-AGAAGACGATCCGTTACAT-MGB)。

1.4 反应条件优化

1.4.1 退火温度: 以 Bb 阳性对照 DNA 为模板, 以 51.0、51.7、53.2、55.3、58.0、60.2、61.4、62.0 °C 为退火温度进行梯度定量 PCR, 设 3 孔平行样进行检测, 筛选最佳退火温度。

1.4.2 探针浓度: 固定引物浓度为 500 nmol/L, 探针浓度分别为 100、200、300、400 和 500 nmol/L, 设 3 孔平行样进行检测, 根据扩增反应的循环阈值(Cycle threshold value, C_t 值)和扩增曲线的荧光信号强度选择最优探针浓度。

1.4.3 引物浓度: 固定探针浓度为最优浓度, 引物浓度为 100、200、300、400 和 500 nmol/L, 设 3 孔平行样进行检测, 根据 C_t 值和扩增曲线的荧光信号强度选择最优探针浓度。

1.5 特异性分析

Prmer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)检查引物特异性, 搜索数据库选择 Genome database (Chromosomes from all organisms), 其余参数选择默认选项。

将 Bb 和其他种巴尔通体、布鲁氏菌等非巴尔通体属细菌及犬、猫、人、鼠和蜚等基因组 DNA 浓度调整至约 10 ng/ μ L, 取模板 1 μ L 进行定量 PCR, 检测该方法的特异性。

1.6 扩增效率检验

1.6.1 标准品制备: 以 BbF 和 BbR 为引物、Bb 标准菌株 ATCC 35685 的 DNA 为模板, 扩增目的基因片段 117 bp; PCR 产物切胶回收纯化后连接到 pEASY-T 载体上; 将连接后载体导入 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆子, 用 PCR 测序方法验证后提取质粒, 作为绘制定量 PCR 标准曲线的标准品。测

定浓度, 换算为拷贝数浓度(拷贝/ μ L)=(质量/相对分子量) $\times 6.02 \times 10^{23}$ 。质粒和含有重组子的阳性甘油菌分别保存于 -20 °C 和 -70 °C。

1.6.2 标准曲线制备: 将质粒标准品原液按 10 \times 倍比稀释, 使浓度达到 10^2 – 10^8 拷贝/ μ L, 引物和探针浓度分别为 200 nmol/L, 进行定量 PCR, 同时做 3 孔平行样。

1.7 敏感性分析

用 10 \times 倍比稀释的标准质粒(10^0 – 10^8 拷贝/ μ L) 为模板, 分别进行定量和常规 PCR, 用于确定此方法的最低检出限, 分析比较 2 种 PCR 扩增反应的敏感性。常规 PCR 引物及模板用量同定量 PCR 优化浓度。

1.8 重复性分析

按探针和引物浓度分别为 200 nmol/L 配制荧光定量 PCR 反应体系, 以 Bb 标准质粒 (2.66×10^4 – 2.66×10^7 拷贝/ μ L) 为模板进行重复性检测。在同一次 PCR 反应中, 每个稀释度标准质粒做 6 个重复孔, 分析组内差异; 用上述相同条件分别进行 6 次独立重复实验, 分析组间差异, 计算变异系数(Coefficient of variation, CV), $CV = \text{标准偏差}(\text{Standard deviation, } s) / \text{平均数}(\text{Mean, } \bar{x})$ 。

1.9 反应体系及参数

定量 PCR 反应体系(20 μ L): 10 μ L Promega GoTaq[®] qPCR Master mix, 0.4 μ L 上、下游引物 (10 μ mol/L), 0.4 μ L 荧光标记探针(10 μ mol/L), 1 μ L DNA 模板, 去离子水补齐。扩增程序: 95 °C 2 min; 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。

常规 PCR 反应体系(20 μ L): 10 μ L Master mix, 0.4 μ L 上、下游引物(10 μ mol/L), 1 μ L 模板, 2 μ L Dye, 去离子水补齐。扩增程序: 95 °C 5 min; 96 °C 5 s, 53 °C 5 s, 68 °C 10 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.10 统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件进行方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 反应条件的优化

2.1.1 退火温度:结果显示从 51–62 °C 上述 8 个温度时, C_t 值在 20.66–21.18 之间, 差异不显著($P>0.05$), 对实验结果影响甚微。因此, 考虑较低温度时容易产生非特异性扩增, 为了使实验具有较高的特异性和保持酶的最佳聚合活性, 选择 60 °C 为退火温度(图 1)。

2.1.2 探针浓度:当探针浓度为 100 nmol/L 时, C_t 值最大(21.21, $P<0.05$), 荧光强度最小; 当探针浓度为 200–500 nmol/L 时, C_t 值在 20.52–20.91 之间, 差别不显著($P>0.05$), 重复实验结果稳定。因此选择 200 nmol/L 为探针的工作浓度(图 2)。

2.1.3 引物浓度:当引物浓度分别为 100、200、300、400 和 500 nmol/L 时, 其 C_t 值在 23.56–23.73 之间,

对实验结果没有影响($P>0.05$)。当引物浓度为 100 nmol/L 时, 荧光信号强度较弱, 扩增曲线趋于平坦, 未呈现典型的“S”型曲线, 即未见到明显的指数扩增期; 当引物浓度过高时容易出现非特异性扩增, 此外考虑到临床应用, 需应尽量减少试剂浪费, 当引物浓度为 200 nmol/L, 获得了理想的扩增效果, 扩增曲线呈现典型的“S”型(图 3), 因此选为引物工作浓度。

2.2 特异性检测

Primer-BLAST 特异性搜索结果显示, 除可以扩增 Bb 的 117 bp 目的基因, 上游引物与袋獾 (*Sarcophilus harrisii*) 的基因组 DNA 有非特异性结合, 可非特异扩增大于 2 000 bp 的片段, 但是这种非特异扩增在实际检测中不可能出现。

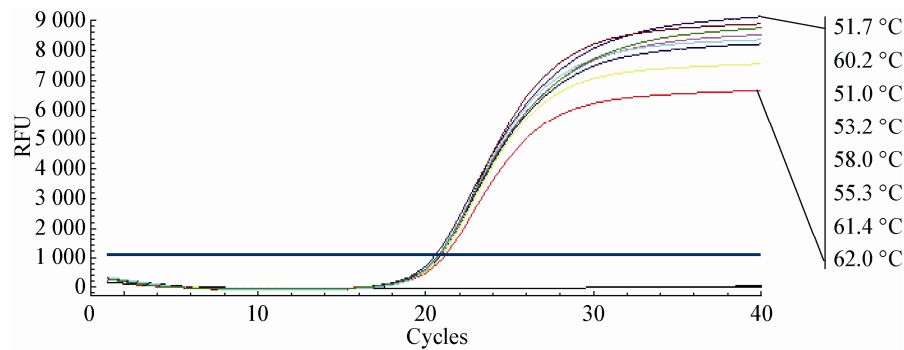


图 1 不同退火温度扩增曲线
Figure 1 Amplification curves under the different temperatures

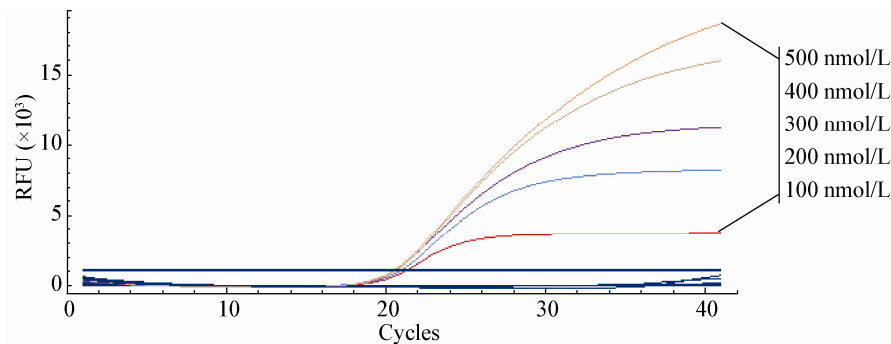


图 2 不同探针浓度扩增曲线
Figure 2 Amplification curves under the different concentrations of the TaqMan probe

Bb 菌株扩增为阳性, Bh 等其他 11 种巴尔通体、布鲁氏菌等 20 种非巴尔通体属细菌和其他动物和人类核酸样品检测均未见荧光信号, 扩增结果为阴性, 空白对照 NTC 为阴性(图 4)。

2.3 扩增效率检验

构建的质粒标准品所使用的 pEASY-T 载体的碱基数为 3 928 bp, 每个碱基的平均分子量为 660 Da/bp, 重组质粒相对分子量即为 $(3\,928+117) \times 660 = 2.67 \times 10^6$, 质粒浓度为 11.8 ng/ μL , 根据公式得出拷贝数浓度为 2.66×10^9 拷贝/ μL 。

从 C_t 值(纵坐标)与质粒标准品拷贝数的对数值(横坐标)绘制的标准曲线可以看出(图 5A 和 B), C_t 值和模板浓度之间呈现良好的线性关系(相关系数 R^2 为 1.000), 扩增效率 E 为 98.18%。因此, 依据标

准曲线公式 $y = -3.366x + 39.88$ 和 C_t 值可以较为准确的计算出样品中目的基因的拷贝数。

2.4 敏感性检测

用 10 倍比稀释的标准质粒 ($2.66 \times 10^0 - 2.66 \times 10^8$ 拷贝/ μL)为模板, 引物和探针浓度均为 200 nmol/L 进行定量 PCR, 扩增效率 E 为 98.4%, R^2 为 1.000。当模板浓度为 10^0 拷贝/ μL 时 C_t 值为 36.84, 为最低检出浓度 2.66×10^0 拷贝/ μL , 即每个反应需 3 个拷贝, 空白对照没有扩增信号(图 6A)。

在常规 PCR 扩增电泳图中, 模板为 10^1 和 10^0 拷贝/ μL 时没有可识别的目的片段, 为 10^3 拷贝/ μL 时, 隐约可见目的带, 但不易判断结果, 空白对照没有扩增带(图 6B)。重复实验结果稳定不变。

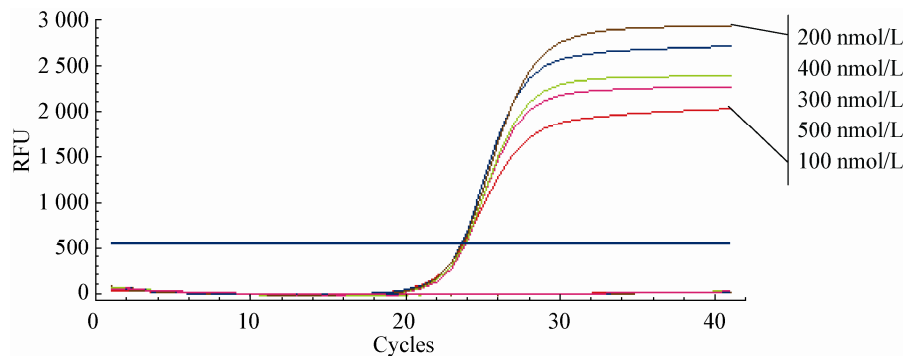


图 3 不同引物浓度的扩增曲线

Figure 3 Amplification curves under the different concentrations of the primers

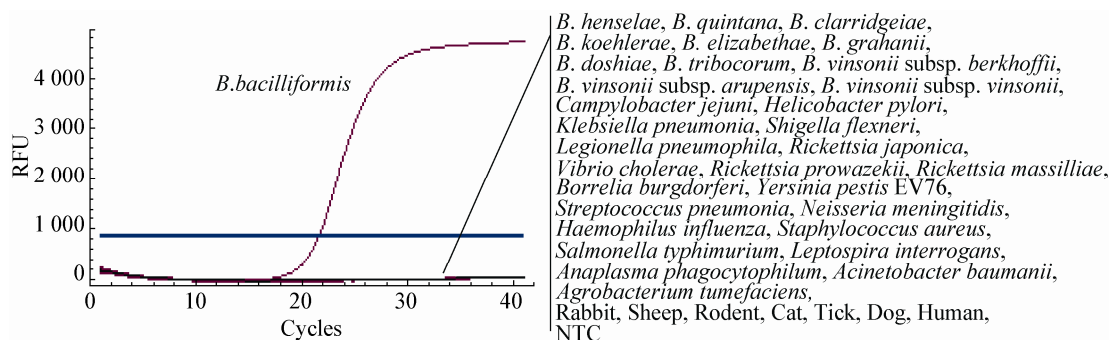


图 4 杆菌样巴尔通体 TaqMan 探针荧光定量 PCR 特异性结果

Figure 4 The result of specificity of real-time PCR using TaqMan assay for the detection of *B. bacilliformis*

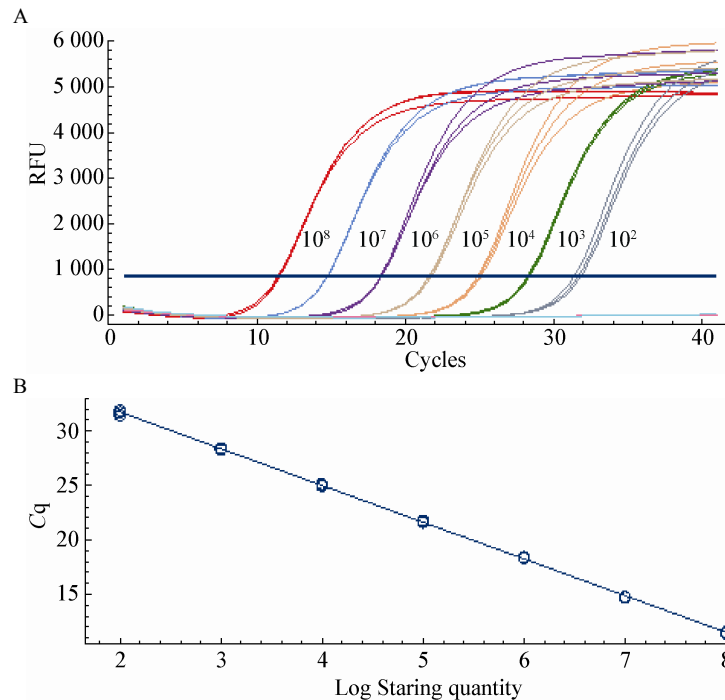


图5 应用标准曲线检测 PCR 扩增效率

Figure 5 PCR amplification efficiency was tested using standard curve

注: A: 标准质粒荧光定量 PCR 的扩增曲线; B: 标准质粒荧光定量 PCR 标准曲线.

Note: A: Amplification curves of real-time PCR for the reference plasmid; B: Standard curve for real-time PCR based on the natural logarithm of plasmid concentrations & C_t values.

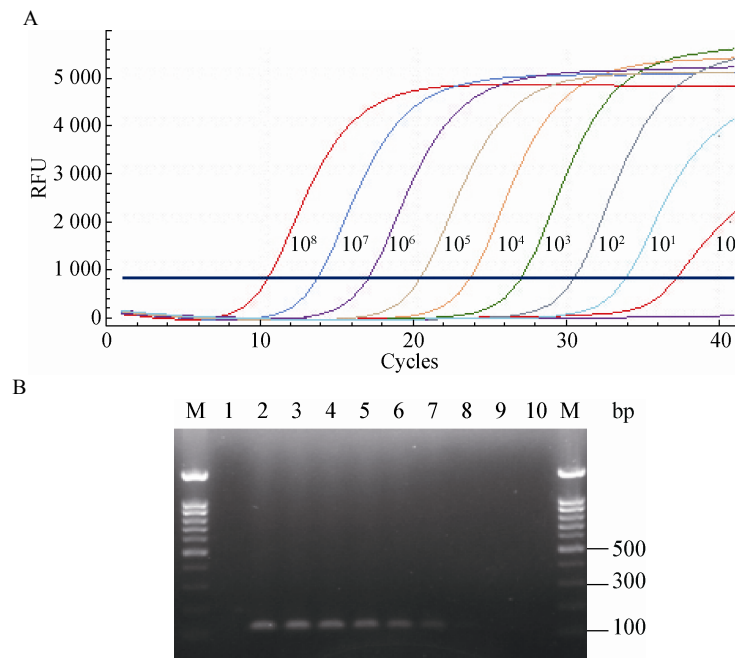


图6 应用不同稀释度标准质粒检测 PCR 扩增的敏感性

Figure 6 Sensitivity of PCR amplification was detected using the different dilutions of the reference plasmid

注: A: 不同稀释度标准质粒荧光定量 PCR 的扩增曲线; B: 不同稀释度标准质粒常规 PCR 电泳图.

Note: A: Amplification curves of real-time PCR for the different dilutions of the reference plasmid; B: Amplification of PCR for the different dilution of the reference plasmid. M: 100 bp ladder molecular weight marker; 1: The blank control; 2-10: The concentrations of the reference plasmid ranging from 10^8 to 10^0 . The loading quantity was 5 μ L.

2.5 重复性分析

组内孔间 CV 值在 0.21%–0.42%之间, 组间重复测定 CV 值在 0.29%–0.59%之间, 均小于 1% (表 1)。

3 讨论

Bb 是南美地区人类重要的致病菌, 能够引起高致死性疾病——奥罗亚热和影响感官、造成病患心理负担的皮肤疾病——秘鲁疣, 早在前印加时代和西班牙殖民时期的军队中就有发病记载。当前, 对秘鲁和厄瓜多尔的本地居民来说, 卡瑞恩病依然是一个重要的公共卫生问题。据报道, 在厄瓜多尔 Bb 所引起的疾病传播的更广泛, 且一些病例表现出无症状或不典型的临床症状而导致误诊^[12], 而对于 Bb 引起的卡瑞恩病, 及早诊断治疗可以显著降低病死率。近年来报道在秘鲁乌鲁班巴(Urubama)地区发生一起卡瑞恩病暴发流行, 并没有在所谓的“疣症地带”, 且 *Lutzomyia verrucarum* 也不是当地白蛉的优势种^[13], 此外传播该疾病的媒介据报道还有另外的白蛉 (*Lutzomyia columbiana* 和 *Lutzomyia peruensis*)^[14], 由此推测可能还存在其他传播媒介或未知的传播方式, 因此带菌人群的流动及非疫区适宜传播媒介的孳生都可能会引起此病的暴发流行。

随着南美旅游热度的增加, 特别是前往此病流行区的游客将成为高危人群^[12]。秘鲁的很多旅游地

如库斯科、马丘比丘、乌鲁班巴和欧岩特坦波等景点都在疫区之内, 我国日益增多的旅游人群使得输入病例的可能性越来越大。与当地人群相比, 外来人群对此病易感染且病情更为严重。因此, 有必要建立一种灵敏度高、特异性强和稳定性好的方法在最短时间内检测出 Bb。

为便于开展对 Bb 的检测和监测调查, 本研究应用基因组比较分析方法先行预测出 Bb 高特异性基因库, 以供筛选特异靶标进行实验验证, 然后从候选基因库中选取了一个 Bb 完全特异的基因, 此基因序列网上 BLAST 没有发现与其匹配的任何片段, 用以设计引物和探针。应用这种生物信息学方法很快筛选出 Bb 的特异基因, 快速锁定靶基因, 加快了核酸诊断标识的发现与后期的实验验证。引物特异性搜索虽然发现了在袋熊基因组中有非特异扩增区, 片段大于 2 000 bp, 这在实际检测时不会出现假阳性干扰, 可以初步认定引物序列的特异性。应用其他多种巴尔通体等阴性对照进一步实验验证了此方法能够种水平高度特异性检出 Bb, 加之最低检测限为 3 拷贝/μL (也即 3 拷贝/反应), 具有极高的灵敏度, 完全能够满足临床诊断的需要。优化获得的反应体系中引物和探针浓度均为 200 nmol/L, 不仅操作方便, 而且使绘制标准曲线具有良好的线性关系和扩增效率, 保证了结果的稳定性。重复性评估实验中组内和组间的变异系数 CV 值分别为 0.21%–0.42%和 0.29%–0.59%, 进一步说明此方法重复性好, 结果稳定可靠^[15]。因此, 可以确信本研究建立的实时荧光定量 TaqMan- MGB 探针法的反应条件得到了最佳优化、实验操作准确, 结果可信, 适用于 Bb 相关疾病的早期诊断、病例筛查、分子流行病学调查和监测。

参考文献

- [1] Noguchi H, Battistini TS. Etiology of oroya fever. I. cultivation of *Bartonella bacilliformis*[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1926, 43(6): 851-864
- [2] Maguina C, Gotuzzo E. Bartonellosis. new and old[J]. Infectious Disease Clinics of North America, 2000, 14(1): 1-22, vii
- [3] Ihler GM. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background[J]. FEMS Microbiology

表 1 TaqMan-MGB 探针法实时荧光定量 PCR 检测杆菌样巴尔通体组内组间重复性

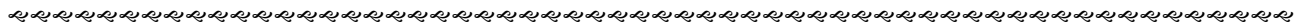
Table 1 Repeatabilities of intra- and inter-groups for real-time PCR based on TaqMan-MGB probe assay of *B. bacilliformis*

Plasmid (copies)	C _t values (wells/groups)		
	\bar{x}	<i>s</i>	CV (%)
2.66×10 ⁷	14.14/14.20	0.033 0/0.068 9	0.23/0.49
2.66×10 ⁶	17.49/17.36	0.075 0/0.102 3	0.42/0.59
2.66×10 ⁵	20.93/20.86	0.044 0/0.102 3	0.21/0.49
2.66×10 ⁴	24.29/24.26	0.058 0/0.070 8	0.24/0.29

注: \bar{x} : 平均值; *s*: 标准偏差; CV: 变异系数。

Note: \bar{x} : Mean; *s*: Standard deviation; CV: Coefficient of variation.

- Letters, 1996, 144(1): 1-11
- [4] Tarazona D, Padilla C, Caceres O, et al. Whole genome sequencing and comparative analysis of *Bartonella bacilliformis* strain INS, the causative agent of Carrion's disease[J]. Genome Announcements, 2013, 1(1): e00053-12
- [5] Del Valle LJ, Flores L, Vargas M, et al. *Bartonella bacilliformis*, endemic pathogen of the Andean region, is intrinsically resistant to quinolones[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2010, 14(6): e506-e510
- [6] Hambuch TM, Handley SA, Ellis B, et al. Population genetic analysis of *Bartonella bacilliformis* isolates from areas of Peru where Carrion's disease is endemic and epidemic[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(8): 3675-3680
- [7] Angkasekwinai N, Atkins EH, Romero S, et al. An evaluation study of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant protein *Pap31* for detection of antibody against *Bartonella bacilliformis* infection among the Peruvian population[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2014, 90(4): 690-696
- [8] Chamberlin J, Laughlin L, Gordon S, et al. Serodiagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection by indirect fluorescence antibody assay: test development and application to a population in an area of bartonellosis endemicity[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(11): 4269-4271
- [9] Sanchez Clemente N, Ugarte-Gil CA, Solorzano N, et al. *Bartonella bacilliformis*: a systematic review of the literature to guide the research agenda for elimination[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2012, 6(10): e1819
- [10] Knobloch J, Solano L, Alvarez O, et al. Antibodies to *Bartonella bacilliformis* as determined by fluorescence antibody test, indirect haemagglutination and ELISA[J]. Tropical Medicine and Parasitology, 1985, 36(4): 183-185
- [11] Smit PW, Peeling RW, Garcia PJ, et al. Dried blood spots for qPCR diagnosis of acute *Bartonella bacilliformis* infection[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2013, 89(5): 988-990
- [12] Lydy SL, Eremeeva ME, Asnis D, et al. Isolation and characterization of *Bartonella bacilliformis* from an expatriate Ecuadorian[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(2): 627-637
- [13] Birtles RJ, Fry NK, Ventosilla P, et al. Identification of *Bartonella bacilliformis* genotypes and their relevance to epidemiological investigations of human bartonellosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(10): 3606-3612
- [14] Rutledge L, Gupta R. Moth Flies and Sand Flies (Psychodidae)[M]. San Diego: Academic Press, 2002: 147-161
- [15] Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR data[J]. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2004, 18(2): 212-214



科技信息摘录

研究揭示 H10N8 禽流感病毒感染人的分子机制

继 2013 年先后在 H5N1 和 H7N9 禽流感病毒跨种间传播研究中取得重要进展后,中国科学院微生物研究所高福课题组在 H10N8 禽流感病毒感染人的分子机制和跨种间传播趋势评估上取得新的进展,研究结果已经于 2015 年 1 月 9 日在国际杂志《自然通信》(Nature Communications)在线发表。

2013 年 12 月起,我国先后发生 3 例人感染 H10N8 禽流感病毒病例,并导致 2 人死亡。这种能感染人的 H10N8 病毒是否像 H7N9 病毒一样具有双受体结合特性,既能结合人源受体,也保留禽源受体结合能力?是否存在大规模扩散的潜在风险?

为了分析这次的 H10N8 病毒的受体结合特异性,研究人员从病毒层面和 HA 蛋白层面,对最早的分离株——江西东湖株 H10N8 禽流感病毒的受体结合特性进行了研究,发现无论在病毒水平还是 HA 蛋白水平, H10 都特异性结合禽源受体,而不像 H7N9 安徽株一样获得了人源受体结合能力。研究人员还利用免疫荧光的方法检测了多种 HA 蛋白对人气管组织及鸭子小肠组织的结合能力,证明 H10 蛋白对表达禽源受体的鸭子小肠组织有很强的结合,但不结合表达人源受体的人气管组织。

为了阐明 H10 蛋白特异性结合禽源受体的分子机制,研究人员利用结构生物学的方法解析了 H10 蛋白与禽源受体和人源受体的复合物晶体结构。结构分析表明,禽源受体结合位点的 137 位精氨酸在 H10 对禽源受体的偏好性结合中起关键作用。

该研究表明这次的能感染人的 H10N8 病毒依然是一个典型的禽流感病毒,对人源受体亲和力极弱,暗示该病毒并不具备在人群中传播的能力。

——摘自《科学网》2015-01-22

<http://paper.sciencenet.cn/htmlpaper/201512211591992135432.shtm>

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>