

DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2012.06.018

TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 快速检测土拉弗朗西斯菌*

赵素慧,王春晖,周莹,韦耀,韩桂圆,钮红岑,赵卫,张其威,万成松

摘要:目的 建立 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法(QF-PCR),快速检测土拉弗朗西斯菌。**方法** 针对土拉弗朗西斯菌的外膜蛋白 *fopA* 基因,利用 Primer 5.0 设计引物及 TaqMan 探针,人工合成 *fopA* 基因保守片段,克隆到载体作为阳性标准品,进行荧光定量检测,制作定量标准曲线,并以合成 *fopA* 基因为模板, P_F 、 P_R 为引物,研究其灵敏度、特异性和准确性。**结果** 构建了含 *fopA* 基因的重组质粒,以不同浓度的重组质粒制作标准曲线,在 $10^3 \sim 10^7$ 拷贝数之间有较好的线性关系。灵敏度试验表明,该方法可检测到 30.6 个拷贝数的重组质粒,比普通 PCR 灵敏度高;特异性试验表明,能选择性检测土拉弗朗西斯菌,而与其他病原菌无交叉反应,与普通菌落 PCR 结果一致;重复性试验表明,拷贝数为 3.06×10^6 样品 5 次平行试验,标准差为 0.201,变异系数为 0.88%。**结论** 本研究建立了 TaqMan 探针 QF-PCR 快速检测技术,具有灵敏度高、特异性强、重复性好等特点,可用于快速、实时、定量检测土拉弗朗西斯菌,为快速检测生物战剂级微生物建立了一种人工合成特异基因 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 新方法。

关键词:土拉弗朗西斯菌;TaqMan 探针;*fopA* 基因;荧光定量 PCR

中图分类号:R378

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2012)06-0602-05

Rapid and quantitative identification of *Francisella tularensis* with TaqMan probe by real-time QF-PCR

ZHAO Su-hui, WANG Chun-hui, ZHOU Ying, WEI Yao, HAN Gui-yuan,
NIU Hong-ling, ZHAO Wei, ZHANG Qi-wei, WAN Cheng-song(Department of Microbiology, School of Public Health and Tropical Medicine,
Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: In order to develop a real-time quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) method for rapid and quantitative identification of *Francisella tularensis* (*F. tularensis*) by using TaqMan probe, the *F. tularensis* outer membrane protein FopA gene *fopA* was synthesized and cloned into vector as the positive standards. The primers and TaqMan probe were designed by Primer 5.0. Results showed that TaqMan QF-PCR method targeting gene *fopA* was established, which produced a good standard curve. Linears ranged from 10^3 to 10^7 copies per microliter. The minimum detection limit was 30.6 copies of recombinant plasmids, which was more sensitive than conventional PCR. *F. tularensis* could be specifically detected from other similar microbes. Repeatability tests showed that the coefficient of variation of 5 parallel tests in same concentration (3.06×10^6 DNA copies) was 0.88% and the standard deviation was 0.201. In conclusion, the QF-PCR with TaqMan probe is sensitive, specific and repeatable, and could be used in safe, rapid, real-time and quantitative identification of *F. tularensis*. With the synthesis of template DNA, we could rapidly develop detection methods for biological agents and dangerous bacteria.

KEY WORDS: *Francisella tularensis*; TaqMan probe; *fopA* gene; QF-PCR

This study was funded by Science and Technology Program in Social Development in Guangdong Province (No. 2010B031000005), and Special Support Program for Science and Technology in the Asian Games in Guangzhou City (No. 2010U1-E00591).

Corresponding authors: WAN Cheng-song, Email:gzwcs@fimmu.com; ZHANG Qi-wei, Email:zhang.qiwei@yahoo.com

* 广东省社会发展领域科技计划项目(2010B031000005),广州市科技亚运专项(2010U1-E00591)

通讯作者:万成松,Email:gzwcs@fimmu.com;
张其威,Email:zhang.qiwei@yahoo.com

作者单位:南方医科大学公共卫生与热带医学学院微生物学系,广州 510515

土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)能引起土拉热(野兔热),革兰阴性,无孢子^[1]。根据生化性质、毒力和地理分布,分为 4 个亚种,土拉热亚种

(*F. tularensis* subsp. *tularensis*) 主要集中在北美地区,全北区亚种(*F. tularensis* subsp. *holarctica*)主要分布在北美、欧洲和亚洲^[1-2],中亚细亚(*F. tularensis* subsp. *mediaasiatica*)与新凶手亚种(*F. tularensis* subsp. *novicida*)主要分布在北美洲,在澳大利亚也有所发现^[3-4],我国以全北区亚种为主^[5]。1957年,我国在黄鼠体内分离到土拉弗朗西斯菌。1959年黑龙江省报道了第一起人间“野兔热”^[6]。1986年山东某肉类加工厂暴发了人间“野兔热”^[7]。土拉弗朗西斯菌以节肢动物叮咬、空气和接触传播为主^[8],通过黏膜或昆虫叮咬侵入临近组织,引起炎症病变反应,在巨噬细胞内寄生,并扩散到全身淋巴和组织器官,引起淋巴结坏死和肝脾肿大,在临幊上表现为发热、黄疸等,严重者死亡。

本研究选择具有良好抗原性的土拉弗朗西斯菌 FopA 外膜蛋白^[9]人工合成 *fopA* 基因保守序列,旨在建立一种灵敏度高、特异性强、快速准确地检测土拉弗朗西斯菌的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与样品 伤寒沙门菌“H”株(H90150097)和炭疽芽孢杆菌减毒株(63002)由北京军事医学科学院惠赠;金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、肠出血型大肠埃希菌 O157:H7(883)和 DH5a 由本实验室保存,所有细菌操作均在二级生物安全实验

室(BSL-2)内进行。土拉弗朗西斯菌阳性模拟模板(*fopA* 基因保守序列)由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.1.2 试剂与耗材 pUC57(Amp⁺)载体为 Promega 公司产品;质粒小提试剂盒为 Omega Bio-Tek 公司产品;Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) 为 TaKaRa 公司产品,DNA marker、2×Taq Master Mix 为 OMEGA 公司产品;TE 溶液、LB 肉汤和琼脂平板培养基等自行配制。

1.1.3 仪器 美国 GE Ultrospec 1100 pro 蛋白核酸检测仪、德国 Bio-Rad T-gradient 梯度 PCR 仪、英国 UVitec 凝胶成像分析系统、美国 Stratagene 实时荧光定量 PCR 仪 Mx3005P、上海一恒 THZ-100 恒温摇床和生化培养箱等。

1.2 方法

1.2.1 设计 *fopA* 基因引物与探针 根据 Larsson 等土拉弗朗西斯菌外膜蛋白 *fopA* 基因序列(GenBank 登录号:CP000437.1; CP000915.1; CP000439.1),利用 DNAMAN 软件进行同源性分析,确定该基因在土拉弗朗西斯菌内的保守片段。采用 Primer Premier 5.0 软件和 Beacon Designer 软件设计 2 条 PCR 引物(P_F、P_R)和 1 条 TaqMan 探针,在 TaqMan 探针的 5'端标记荧光基团 FAM,3'端标记淬灭基团 BHQ(如表 1 所示)。引物和 TaqMan 探针由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1 土拉弗朗西斯菌外膜蛋白 *fopA* 基因上的引物和 TaqMan 探针序列

Tab. 1 Sequences of primers and TaqMan probe for gene *fopA*

Name	Sequence 5'-3'	Position
The Forward Primer(P _F)	5'-TGGTT TAGGTGAAGG TGTTGTAAAC-3'	366—390
The Reverse Primer(P _R)	5'-GTGC TTGGGATGTT GGTGGT-3'	467—486
TaqMan Probe	5'-GCAGGTG GTGCTGGTTG GGCAAAT-3'	424—447

1.2.2 构建 *fopA* 标准质粒 土拉弗朗西斯菌为严格管控菌种,菌体样本较难获得。本研究根据 GenBank 上的 *fopA* 基因序列,参考扩增序列位置,人工合成一条 121bp 基因序列。以合成基因为模板,以 P_F、P_R(见表 1)为引物,PCR 扩增,产物回收、纯化,连接到 pUC57(Amp⁺)载体,制备重组质粒,后转化到 DH5a 感受态细胞,增殖培养,经质粒小提试剂盒抽提回收,利用蛋白核酸检测仪测定重组质粒浓度和纯度,PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 制作标准曲线 对重组质粒进行 10 倍梯度浓度稀释,以不同稀释浓度的质粒为模板,以 P_F、P_R

为引物进行 QF-PCR 检测。优化的反应体系为 Premix Ex TaqTM 10.0 μL、上下游引物和荧光探针(10 μmol/L)各 0.5 μL、ROX Reference Dye II 0.5 μL、DNA 模板 2.0 μL、去离子水 6.0 μL,共 20.0 μL。95℃ 预变性 30 s,以 95℃ 10 s,60℃ 60 s(收集 FAM 荧光信号),扩增 40 个循环,反应时间约 79 min。检测各梯度标准品的 Ct 值,以质粒拷贝数为横坐标,Ct 值为纵坐标建立质粒标准曲线。

1.2.4 检测 QF-PCR 敏感度 将已知拷贝数的重组质粒用 TE 溶液进行 10 倍梯度极限稀释,以 3.06 × 10³~3.06 × 10¹⁰ 拷贝数的重组质粒模板分别进

行 QF-PCR 和普通 PCR 检测，并用 2.0% 的凝胶电泳检测。比较两种方法对基因片段的最低检出限。

1.2.5 检验 QF-PCR 特异性 以含重组质粒的 DH5 α 工程菌为阳性样品，以伤寒沙门菌、炭疽芽孢杆菌减毒株、金黄色葡萄球菌、肠出血型大肠埃希菌等细菌作为阴性对照菌株，再用以上细菌与 DH5 α 工程菌的混合培养液作为模拟样品，以去离子水作为无模板空白对照 (No template control, NTC)。琼脂平板常规培养细菌，挑单菌落转到 LB 液体培养基，200 r/min 震荡培养 12~16 h，最后将菌液稀释 100 倍，制作样本。普通 PCR (95℃ 预变性 10 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s，扩增 45 个循环，终延伸 72℃ 5 min，反应时间约 71 min) 和 QF-PCR (95℃ 预变性 10 min, 95℃ 10 s, 60℃ 收集 FAM 荧光信号 30 s，扩增 45 个循环，反应时间约 75 min)，比较最小检测限度。

1.2.6 QF-PCR 重复性实验 以拷贝数为 3.06×10^6 的重组质粒作为检测模板，相同条件分别进行 5 组重复检测试验 (每组 3 个平行)，取 Ct 值平均数，得出 Ct 值变异系数，来初步评估该方法的重复性和重现性。

2 结 果

2.1 阳性样品的制备与鉴定 人工合成 *fopA* 基因片段后，克隆到 pUC57(Amp $^+$) 载体，制成重组质粒，经抽提检测，重组质粒浓度为 93.45 ng/ μ L，作为阳性样品标准品。根据 Avogadro's Number 计算，重组质粒的拷贝数为 3.06×10^{10} copies/ μ L。取稀释的重组质粒作为模板，用上下游引物进行 PCR 扩增，2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果如图 1 所示，在 100 bp 附近可见一条带，大小为 121 bp，与预期一致。

2.2 QF-PCR 标准曲线 利用优化的反应体系，对 5 个 10 倍梯度稀释的定量标准品进行 QF-PCR 检测，结果如图 2 所示。质粒拷贝数为横坐标，Ct 值为纵坐标，制作标准曲线，在 $3.06 \times 10^3 \sim 3.06 \times 10^9$ 拷贝数间有良好的线性关系，相关系数为 0.994，扩增效率为 104.8%，得出标准品拷贝数与 Ct 值的线性方程为： $Ct = -3.213 \times \text{LOG}(\text{copies}) + 41.32$ 。对样品进行检测，根据其 Ct 值和线性方程可获得该样品 DNA 拷贝数。

2.3 QF-PCR 灵敏度 将已知拷贝数的重组质粒进行 10 倍梯度极限稀释，对 $3.06 \times 10^6 \sim 3.06 \times 10^1$ 拷贝数标准品质粒分别进行 QF-PCR 和普通 PCR 检测，结果如图 3 所示。QF-PCR 检测方法最低能

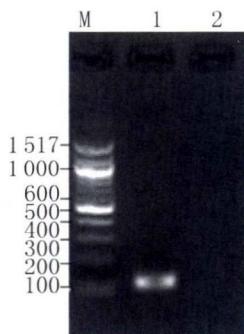


图 1 土拉弗朗西斯菌 *fopA* 基因扩增片段鉴定
M: 100bp DNA Ladder marker; 1: 扩增的目的片段 (121bp); 2: 无模板空白对照

Fig. 1 Identification of *fopA* gene amplification clips
M: 100bp DNA Ladder marker; 1: PCR amplification product (121bp); 2: NTC

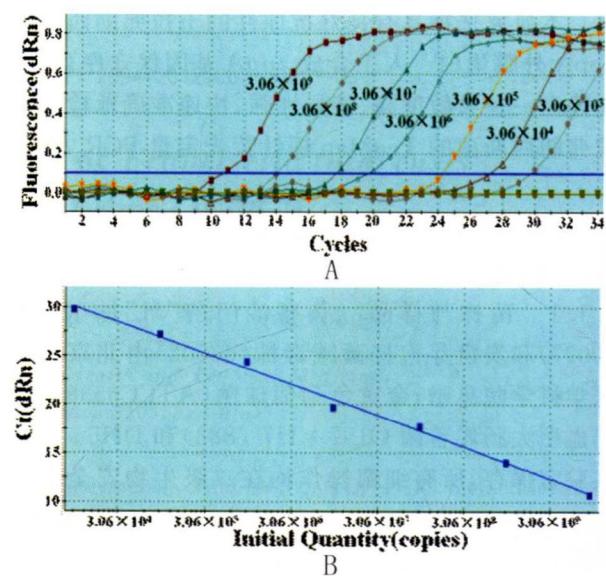


图 2 标准品质粒 QF-PCR 扩增曲线
A: 标准品质粒动力学曲线
B: 标准品质粒标准曲线

Fig. 2 Amplification curve of standard plasmids by QF-PCR
A: QF-PCR dynamic curve of recombinant plasmids;
B: Standard curve of plasmids

检测到 3.06×10^1 个 DNA 拷贝数，而普通 PCR 只能检测到 3.06×10^6 个 DNA 拷贝数。

2.4 QF-PCR 特异性 利用本实验建立的土拉弗朗西斯菌 QF-PCR 检测方法，对 4 株血液、水源、接触途径传播的细菌与土拉弗朗西斯菌标准品进行检测，结果显示，只有含 *fopA* 基因扩增片段的 2 个样品出现典型的扩增曲线，其余与空白对照均为一平直线，无 Ct 值，如图 4 所示，判断为阴性。该结果与普通 PCR 检测结果完全一致，如图 5 所示，两者比较结果如表 2 所示。

2.5 QF-PCR 的重复性 为评估该方法的重复性

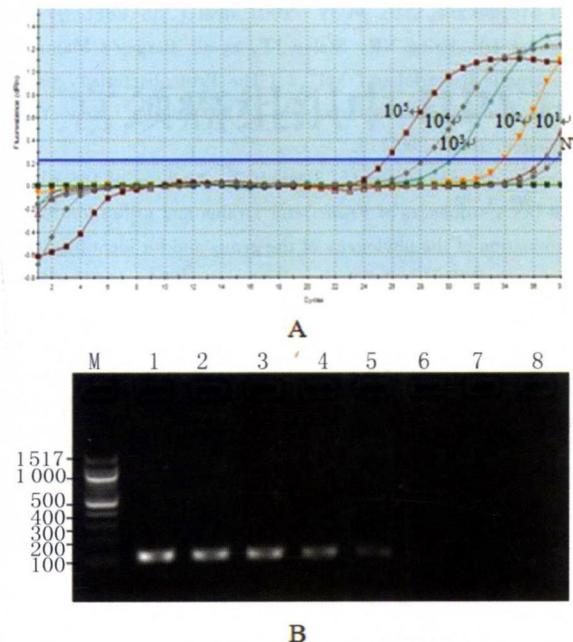


图 3 土拉弗朗西斯菌 QF-PCR 和普通 PCR 检测的极限浓度

A: QF-PCR 检测结果; B: 普通 PCR 检测结果。M: 100bp DNA Ladder marker; 1~7: 拷贝数为 $3.06 \times 10^9 \sim 3.06 \times 10^3$ 的标准质粒; 8: 无模板空白对照

Fig. 3 Detection limit of *F. tularensis* by QF-PCR and conventional PCR

A: QF-PCR result; B: Conventional PCR result; M: 100bp DNA Ladder marker; 1-7: Plasmids copies of $3.06 \times 10^9 \sim 3.06 \times 10^3$; 8: NTC

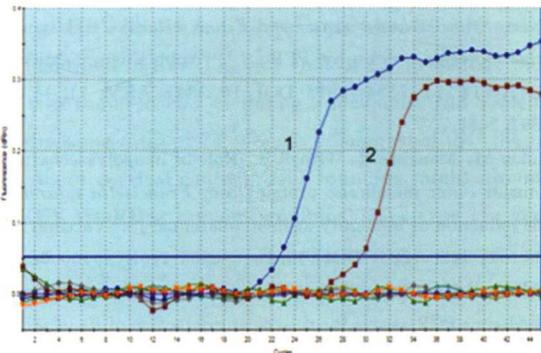


图 4 土拉弗朗西斯菌 QF-PCR 特异性实验结果

1. DH5a 工程菌(121bp); 2. DH5a 混合菌^a
a: DH5a 混合菌是指含土拉弗朗西斯菌模板的 DH5a 菌与金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌、炭疽芽孢杆菌及大肠埃希菌混合后形成的模拟样品。

Fig. 4 Specificity of *F. tularensis* by QF-PCR

1: DH5a (121bp);
2: DH5a mix^a;
a: Mixed bacteria of DH5a refers to the cultured DH5a, *Staphylococcus aureus*, *Typhoid bacillus*, *Bacillus anthracis*, and *E. coli*.

和重现性,本研究对拷贝数为 3.06×10^6 的重组质粒在相同实验条件下分别进行 5 组重复检测试验

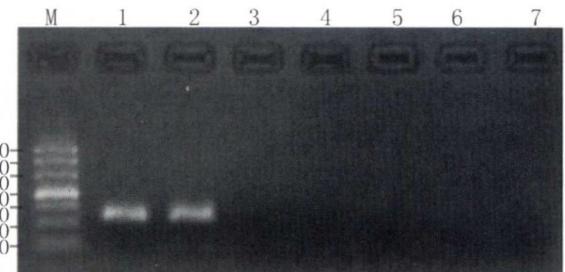


图 5 土拉弗朗西斯菌普通 PCR 特异性实验结果

M: 50bp DNA Ladder marker; 1. DH5a 工程菌 (121bp); 2. DH5a 混合菌^a; 3. 金黄色葡萄球菌; 4. 伤寒沙门菌 (H901); 5. 炭疽芽孢杆菌减毒株; 6. EHEC O157: H7 883; 7. 无模板空白对照
a: DH5a 混合菌是指含土拉弗朗西斯菌模板的 DH5a 菌与金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌、炭疽芽孢杆菌及大肠埃希菌混合后形成的模拟样品

Fig. 5 Specificity of *F. tularensis* by PCR

M: 50bp DNA Ladder marker;
1: DH5a (121bp); 2: DH5a mix^a; 3: *Staphylococcus aureus*; 4: *Typhoid bacillus* (H901); 5: *Bacillus anthracis*; 6: EHEC O157: H7 883; 7: NTC
a: The mixed bacteria of DH5a refer to the cultured DH5a, *Staphylococcus aureus*, *Typhoid bacillus*, *Bacillus anthracis*, and *E. coli*.

表 2 土拉弗朗西斯菌 QF-PCR 特异性实验结果

Tab. 2 Specificity of *F. tularensis* by QF-PCR

Samples	Ct (dRn)	PCR
DH5a	23.86	+
DH5a mix ^a	27.73	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	No Ct	-
<i>Typhoid bacillus</i> (H901)	No Ct	-
<i>Bacillus anthracis</i>	No Ct	-
EHEC O157: H7 883	No Ct	-
NTC	No Ct	-

a: DH5a 混合菌是指含土拉弗朗西斯菌模板的 DH5a 菌与金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌、炭疽芽孢杆菌及大肠埃希菌混合后形成的模拟样品

a: The mixed bacteria of DH5a refer to the cultured DH5a, *Staphylococcus aureus*, *Typhoid bacillus*, *Bacillus anthracis*, and *E. coli*

(每组 3 个平行),取 Ct 值平均数,最后得出 Ct 值变异系数,并统计获得的 Ct 值。结果显示,标准差为 0.201,变异系数为 0.88%,表明本实验建立的土拉弗朗西斯菌 QF-PCR 检测方法重现性较好,可对土拉弗朗西斯菌样品进行稳定、可靠的检测。

3 讨论

土拉弗朗西斯菌具有高传染性,严重威胁公共卫生安全,美国 CDC 将其归为 A 类重要细菌,美军将其列入为重要的生物战剂目录^[10]。土拉弗朗西斯菌生长缓慢,培养条件苛刻,现今常用细菌培养及

ELISA 等检方法,但耗时耗材,易造成实验室感染,极不安全。

本研究利用 QF-PCR 技术,选择土拉弗朗西斯菌外膜蛋白的特异性基因 *fopA* 作为靶基因,选取其中一段保守片段设计引物和探针,构建重组质粒,作为标准品和模拟阳性标本,在 TaqMan 探针的 5' 端标记荧光基团 FAM,3' 端标记淬灭基团 BHQ, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,对人工模拟的土拉弗朗西斯菌进行定量检测分析,以实现对未知样品中土拉弗朗西斯菌的定性定量检测。

本实验所建立的 QF-PCR 技术的灵敏度达到 30.6 个 DNA 拷贝数水平,比普通 PCR 3.06×10^6 检测灵敏。重复性试验结果显示,同一浓度的 15 个样品检测 Ct 值变异系数为 0.88%,说明该方法重复性好,能保证对样品进行稳定、可靠的检测。同时 QF-PCR 过程中无需电泳检测、不使用溴化乙锭,保障了实验人员的安全,结合菌落 PCR 技术更是简化了细菌基因组提取的繁琐步骤。从样品送检到 QF-PCR 反应完成只需 2h,比常规的细菌培养、免疫检测等方法缩短了检测时间,降低损耗,提高检测效率。

本研究在无法获得该细菌样本的条件下,通过人工合成土拉弗朗西斯菌 *fopA* 基因的特异保守序列,构建重组质粒,作为检测的模拟阳性样品,设计引物和探针,与普通 PCR 进行比较,研究 QF-PCR 方法的灵敏度和特异性,从而为一些高度危险、难以获得样品的生物战剂级微生物的定性定量检测建立了一套快速、灵敏和特异的 QF-PCR 检测方法。

实验结果证明, *fopA* 基因的 QF-PCR 检测特异性好,检测速度快,灵敏度高,比 ELISA 等其他快速检测方法具有明显优势。本研究建立的方法为土拉弗朗西斯菌的快速定量检测和流行病学调查提供了新的实验室检测手段,适用于进出口物品检验检疫、生物安全应急检测(尤其是血液样品)、致病菌的临床诊断以及生物安全防护等领域,应用前景广阔。

参 考 文 献:

[1] Ellis J, Oyston PC, Green M, et al. Tularemia[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(4): 631-646. DOI: 10.1128/CMR. 15. 4.

631-646. 2002

- [2] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria) [M]. 2nd Edition. New York: Springer, 2005, 200-210.
- [3] Forsman M, Sandström G, Sjöstedt A. Analysis of 16S ribosomal DNA-sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(1): 38-46. DOI: 10.1099/00207713-44-1-38
- [4] Whipp MJ, Davis JM, Lum G, et al. Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia [J]. J Med Microbiol, 2003, 52(Pt 9): 839-842. DOI: 10.1099/jmm. 0.05245-0
- [5] Wang YH, Hai R, Zhang ZK, et al. Preliminary study and phylogenetic analysis of the subspecies of *Francisella tularensis* in China[J]. Chin J Vector Biol Control, 2011, 22(1): 8-10. (in Chinese)
- [6] Kang CG. Epidemiological survey report of first appearance of human infected with tularemia in China[J]. J Epidemiol, 1980, 1(4): 248-250. (in Chinese)
- [7] Kang CG. Epidemiological survey report of first appearance of human infected with tularemia in China[J]. J Epidemiol, 1980, 1(4): 248-250. (in Chinese)
- [8] Jiang JT, Chen FR, Yang YH, et al. Investigation on human infected with *F. tularensis* in Shandong Province[J]. Chin J Zoonoses, 1990, 6(6): 48-49. (in Chinese)
- [9] Kugeler KJ, Gurfield N, Creek JG, et al. Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts when screening ticks by PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11): 7594-7597. DOI: 10.1128/AEM. 71. 11. 7594-7597. 2005
- [10] Fulop M, Manchee R, Titball R. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein form *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia[J]. Vaccine, 1995, 13(13): 1220-1225. DOI: 10.1016/0264-410X(95)00062-6
- [11] Mitchell JL, Chatwell N, Christensen D, et al. Development of real-time PCR assays for the specific detection of *Francisella tularensis* ssp. *tularensis*, *holartica* and *mediaasiatica*[J]. Mol Cell Probes, 2010, 24(2): 72-76. DOI: 10.1016/j.mcp. 2009. 10. 004

收稿日期:2011-11-24;修回日期:2012-03-29