DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.047
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1104 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1104-03

半套式PCR和DNA探针技术检测Q热立克次体

胡廷徽,温博海,万泽生,俞树荣 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 建立半套式PCR和DNA探针技术由于检测Q热立克次体。方法 依据已知的Q热立克次体的16S和23S rRNA基因及其间区的序列,设计3条引物,建立了扩增16S-23S rRNA基因间区的半套式PCR方法,并将扩增片段制成探针,建立了斑点杂交技术。结果 10株Q热立克次体分离株均可扩增出572 bp的PCR条带,而对照菌都为阴性,此半套式PCR方法的灵敏度高达1 pg;用九里株扩增片段标记后制成的探针,与10个Q热立克次体分离株的全DNA呈阳性杂交,对照菌为阴性,此杂交方法的灵敏度为0.5 ng。结论 基于Q热立克次体16S-23S rRNA基因间区的半套式PCR和DNA探针技术具有较好的特异性和灵敏度,可联合应用于Q热的病原学诊断。

关键词:半套式PCR;DNA探针;Q热立克次体
中图法分类号:R376.4;R394;R446.9 文献标识码:A

Detection of *Coxiella burnetii* by semi-nested PCR and DNA probe

HU Ting-hui, WEN Bo-hai, WAN Ze-sheng, YU Shu-rong (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To establish a rapid and sensitive method for detection of *Coxiella burnetii*. **Methods** The semi-nested PCR had been established by using 3 primers designed based on the sequence of the 16S rRNA and 23S rRNA genes and their intergenic region and the amplimer of *Coxiella burnetii* genomic DNA was labeled with P32 as a probe in dot-blot hybridization. **Results** The predicted products were amplified from the genomic DNA of all 10 *Coxiella burnetii* isolates but not from controls in both semi-nested PCR and hybridization assays. The semi-nested PCR and probe detected as little as 1pg and 0.5ng of *Coxiella burnetii* genomic DNA, respectively. **Conclusion** The semi-nested PCR and DNA probe are highly sensitive and specific for detection of *Coxiella burnetii* and can be widely used in the diagnosis of Q fever.

Key words: semi-nested PCR; DNA probe; Coxiella burnetii

Q热是全世界分布的人兽共患病,其病原体贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*,俗称Q热立克次体)是一种急性细胞内寄生菌[1]。

严格的胞内寄生使得外界因素对Q热立克次体基因组的影响明显减弱。胞外菌中变异较大的16S-23S rRNA基因间区在Q热立克次体不同分离株中趋于保守。Stein[2]对法国分离株及我们对中国分离株的研究都证实了这个观点。这些结果提示16S-23S rRNA基因间区在Q热立克次体诊断上具有广泛地应用前景。我们根据已知的Q热立克次体特异的16S-23S rRNA基因间区序列,设计了3个引物,用于建立半套式PCR方法。另外,还标记扩增产物作为探针建立了斑点杂交方法。这两种方法都有较高的特异性和灵敏度。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 Q热立克次体菌株 本次研究共使用10株Q热立克次体分离株。Grita株1957年由军事医学科学院引自前苏联。1961年引入我室。原始传代情况不明。在我室连续用鸡胚传84代。经单克隆抗体证实为I相。九里株和Henzerling株购自北京生物制品研究所,现为我室保存菌株。七医株1962年分离自四川一慢性迁延达11个月的Q热患者,病人起初有发热、胸痛、咳嗽等急性Q热表现,以后疾病长期迁延,X光片显示腰5左侧横突与骶成关节,有进行性骨质破坏和增生。雅安株1964年分离自四川一Q热患者,疾病初期也有急性Q热症状,入院后,经23 d住院治疗,康复出院。YH-11株1965年由云南郊区一农民Q热病人体内分离,患者有发热、胸痛、咳嗽、痰中带血等症状。李株1981年分离自内蒙古一发热、头痛呈感冒症状的病人。新桥株1964年从四川犬体外寄生的铃头血蜱中分离。YS-8和YS-9都分离自从云南的绵羊胎盘。

1.1.2 其它菌株 猪布氏杆菌、大肠埃希菌DH5α株、铜绿假单胞菌Pa1株、莫氏立克次体、肺炎衣原体、米克戴德军团菌、嗜肺军团菌1型和8型为我室保存菌株。

1.1.3 酶与试剂 随机引物DNA标记试剂盒购自Gibco公司;放射性同位素[α-^{32}P]ATP购自北京亚辉生物医学工程公司;其余常规试剂和硝酸纤维素膜均为国产。

1.2 实验方法

1.2.1 Q热立克次体菌株的繁殖 菌种均接种鸡胚,在卵黄囊膜中生长繁殖,感染卵黄囊膜涂片后经Gimenez染色镜检,选择含立克次体较多(镜下每个视野可见50~100个菌体)的卵黄囊膜。

1.2.2 16S-23S ISR DNA的半套式PCR扩增:根据Q热立克次体rRNA操纵元的序列设计二引物ISR-1:5′-AGGCTAAC-CTTCGGGAG-3′,23S-R:5′-TATGGCTGAACTTTCCA-3′,PCR法扩增9株Q热立克次体分离株的ISR。在0.5 ml反应管内加入1 μl基因组DNA,1 μl 10 mmol/L dNTP,5 μl PCR缓冲液(10×),10 μl 15 mmol/L $MgCl_2$和1.25 U的Taq酶(Sangon Ltd, Canada),补ddH_2O至50 μl总容积,PCR反应条件为95 ℃预变性7 min后,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39740008)
作者简介:胡廷徽(1973—),男,浙江省慈溪市人,硕士,助教,主要从事Q热立克次体方面的研究。电话:(023)68752239
收稿日期:2001-07-07;修回日期:2001-08-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

再行 30 个循环, 每个循环为 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min 和 72 ℃ 1 min, 循环后 72 ℃延伸 10 min。取 1 μl 反应产物作模板, 以 ISR-L 和 ISR-R 为引物进行二次扩增, 再在反应管内加入 1 μl 10 mmol/L dNTP, 5 μl PCR 缓冲液(10×), 10 μl 15 mmol/L $MgCl_2$ 和 1.25 U 的 Taq 酶(Sangon Ltd, Canada), 补 ddH_2O 至 50 μl 总容积, 扩增条件同首次扩增, 共 35 个循环; 取 10 μl 反应产物在含 0.5 μg/ml EB 的 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察结果。

1.2.3　DNA 斑点杂交

1.2.3.1　探针制备　　半套式 PCR 扩增九里株 16S-23S rDNA 基因间区, 扩增产物经 DNA 回收试剂盒(DNA Gel Extraction Kit, NCBC-Sangon)回收后, 用[α-^{32}P] ATP 通过随机引物标记法制成探针, 并用 TCA(三氯乙酸)纸片沉淀法测其放射比活性。

1.2.3.2　DNA 斑点膜的制作　　将硝酸纤维素膜剪成适当大小, 浸于 2× SSC 5 min 后, 20× SSC 浸泡 2 min。经 100 ℃变性 10 min 后的 DNA 点样于已处理过的硝酸纤维素膜上, 80 ℃烤 2 h 备用。将九里株全 DNA 按 10 倍稀释成不同浓度点样作探针敏感性测定。

1.2.3.3　DNA 分子的预杂交、杂交及洗膜　　上述制备好的 DNA 膜置入预杂交液[200 μg/ml 小牛胸腺 DNA(100 ℃变性 10 min 后加入), 5× Denhardt, 5× SSC, 100 mmol/L Tris-HCL(pH 7.5), 0.1%SDS] 中, 68 ℃水浴预杂交 3~4 h, 加入 5 μl α-^{32}P 标记的 ISR DNA(100 ℃变性 10 min 后加入), 使得杂交液的放射性为(1~2)× 10^6 cpm/ml, 68℃杂交 16~18 h, 然后依次在下述条件下漂洗 DNA 膜: 2× SSC-0.1%SDS 室温洗 5 min, 重复 3 次; 0.1× SSC-0.1%SDS 68 ℃洗 15 min, 重复 3 次; 0.1× SSC 68 ℃洗 30 min, 重复 2 次。于-70 ℃放射自显影 72 h, 常规冲洗胶片。

2　结果

2.1　半套式 PCR 的特异性和敏感性

10 株 Q 热立克次体分离株均扩增到一约 570 bp 的阳性产物, 但对照菌包括莫氏立克次体、肺炎衣原体、米克戴德军团菌、嗜肺军团菌 1 型和 8 型、布氏杆菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌均无阳性扩增带出现。敏感性测定: 将立克次体全 DNA 梯度稀释后作模板, 研究常规 PCR 的检出限, 发现半套式 PCR 的灵敏度高达 1pg Q 热立克次体全基因组 DNA, 见图 1。其中的 1 000 pg 和 100 pg 的模板浓度过高抑制了 PCR 扩增, 稀释后均能扩增出阳性条带, 见图 2。另外, 实验还发现用 ISR-L 和 23S-R 两条引物建立的常规 PCR 方法灵敏度只有 10pg Q 热立克次体全基因组 DNA, 比半套式 PCR 低一个数量级, 提示半套式 PCR 具有较高的灵敏度。

2.2　DNA 斑点杂交结果

半套式 PCR 扩增的九里株 ISR DNA 用随机引物标记法进行标记后制成探针。该探针能与 10 株 Q 热立克次体分离株的全 DNA 呈阳性杂交, 见图 3A。而与莫氏立克次体等 8 个对照菌株的全 DNA 无杂交, 提示此探针有较高的特异性, 结果见图 3B。另外, 此探针可检出 0.5ng 的 Q 热立克次体基因组 DNA 与质粒探针和基因组合 DNA 探针敏感度相近, 见图 3C。



图 1　半套式 PCR 特异性试验结果

Fig 1　Results of specificity test of semi-nested PCR

1: *Chlamydia pnemoniae*; 2: *Legionella micdadei*; 3: *Legionella pneumophila* (type 8); 4: *Legionella pneumophila* (type 1); 5: *Coxiella burnetii* (Nine Miles); 6: Marker; 7: *Rickettsia mooseri*; 8: *Brucella suis*; 9: *Escherichia coli*; 10: *Pseudomonas aeruginosa*

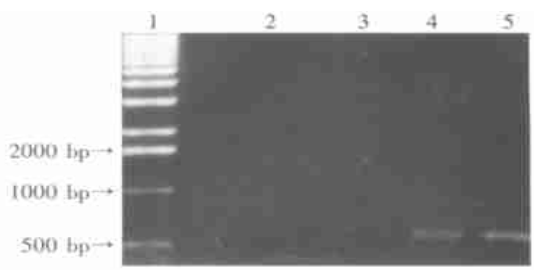


图 2　半套式 PCR 敏感性试验结果

Fig 2　Results of sensitivity test of semi-nested PCR

1: Marker; 2: Genomic DNA of Nine Miles (1 000 pg); 3: Genomic DNA of Nine Miles (100 pg); 4: Genomic DNA of Nine Miles (10 pg); 5: Genomic DNA of Nine Miles (1 pg)

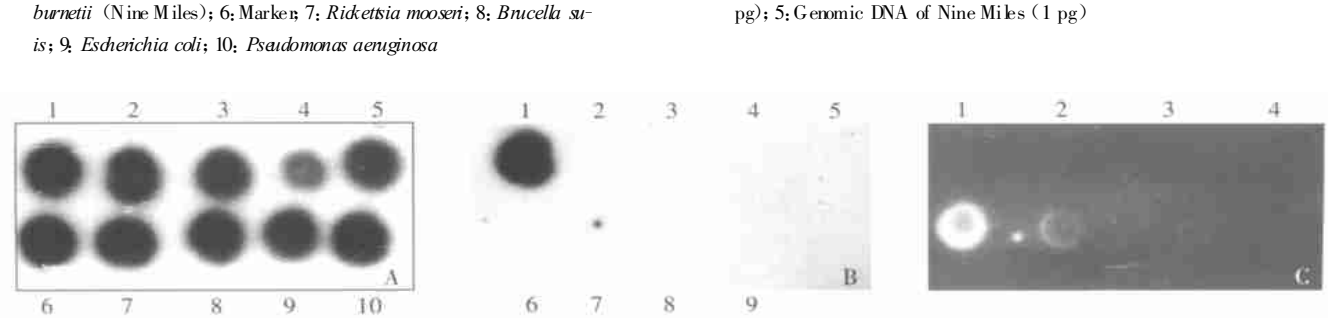


图 3　斑点杂交结果

Fig 3　Results of dot-blot hybridization

A: Results of dot-blot hybridization of 10 coxiella burnetii isolates; 1: Nine miles; 2: Qiyi; 3: Xinqiao; 4: Yaan; 5: Li; 6: Grita; 7: Henzerling; 8: YS-8; 9: YS-9; 10: YH-11

B: Results of specific test of ISR probe; 1: *Coxiella burnetii* (Nine Miles); 2: *Chlamydia pneumoniae*; 3: *Legionella micdadei*; 4: *Legionella pneumophila* (type 8); 5: *Legionella pneumophila* (type 1); 6: *Rickettsia mooseri*; 7: *Brucella suis*; 8: *Escherichia coli*; 9: *Pseudomonas aeruginosa*

C: Results of sensitivity test of ISR probe; 1: Genomic DNA of Nine Miles (10 ng); 2: Genomic DNA of Nine Miles (1 ng); 3: Genomic DNA of Nine Miles (0.5 ng); 4: Genomic DNA of Nine Miles (0.1 ng)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

对于 Q 热的诊断，仅仅依赖于临床症状容易造成误诊。我国到目前为止所发现的 Q 热病例，绝大多数均是临床上初诊为发热待诊、上呼吸道感染、流感、支气管肺炎、沙门菌感染、传染性肝炎或其他热性传染病者。实验室诊断是确诊 Q 热和进行流行病学调查的重要手段。从患者体内或其它标本中分离鉴定病原体，虽然是证实 Q 热最确切的方法，但耗时长，并且需要特殊的实验条件，不易推广。

血清学诊断是 Q 热最常用的特异性诊断方法，其特异性很高。在病程中几份血清 Q 热抗体滴度不断增长，恢复期滴度高于急性期 4 倍以上，对确定 Q 热诊断有重要意义。常用的补体结合实验、微量凝集试验、间接免疫荧光技术及 ELISA 等，由于操作方便，已在临床上得到广泛应用。其它血清学方法包括免疫印迹、对流免疫电泳、抗球蛋白致敏及放射性同位素沉淀实验等，也可用于 Q 热的诊断。但这些试验有的需纯净抗原量较大，有的操作较繁琐，难以作常规血清学诊断用[1]。另外，由于抗体往往在病后几年还存在，现症感染和既往感染需要收集病程中的几份血清，确定抗体滴度明显增长才能辨别，这种回顾性的分析往往对治疗病人已失去指导价值。

作为病原学诊断的核酸探针技术和 PCR 技术近年来在 Q 热的诊断上应用广泛。用 Q 热立克次体质粒 DNA 片段制备的探针可测出血、尿及组织标本中的立克次体达 10^4 细胞和少于 1 ng Q 热立克次体 DNA；如果结合 PCR，则其敏感性可达 1 ~ 10 个立克次体细胞[3]。Stein 等[4]报道以 Q 热立克次体的超氧化物歧化酶的序列设计引物，可检出含 10 个立克次体细胞的标本。

Q 热立克次体分离株间 16S-23S ISR 十分保守，而且其序列为 Q 热立克次体所特有。因此，可以依据该区设计特异性引物或探针用作 Q 热病原学诊断。我们以自行设计的 3 条引物 ISR-L、ISR-R 和 23S-R 分别建立了常规 PCR 和半套式 PCR 方法。ISR-L 和 23S-R 在 10 株 Q 热立克次体分离株中均扩增到 864 bp 的片段，此片段包括 16S-23S ISR 和一部分 23S rRNA 基因序列。而在 8 个对照菌中均未扩增出阳性片段。此常规 PCR 的检测敏感度为 10 pg。半套式 PCR 以 ISR-L 和 23S-R 作为首次扩增引物，ISR-L 和 ISR-R 作为二次扩增引物，用此法在 10 株 Q 热立克次体分离株中扩增到 572 bp 的片段，此片段即 16S-23S ISR 区域。而 8 个对照菌无此阳性片段出现，提示此半套式 PCR 的高度特异性。而且半套式 PCR 比常规 PCR 更为灵敏，敏感度为 1 pg。

我们还以 16S-23S ISR 作为探针，建立了 DNA 斑点杂交法。此探针只与 10 株 Q 热立克次体基因组 DNA 有阳性杂交，而与其它 8 个对照菌基因组 DNA 呈阴性，证明该方法具有很好的特异性。此探针可检出 0.5 ng 的 Q 热立克次体基因组 DNA，与 Frazier 等[3]使用的质粒探针和余全等使用的基因组全 DNA 探针敏感度相近[5]。

为了使 16S-23S ISR 探针能够长期保存，我们把 ISR 克隆入 pUCm-T 质粒。用插入 ISR 的 2 号质粒作为探针，也获得了与 PCR 产物探针相同的特异性和敏感性。另外，我们还用探针对 Q 热立克次体感染的小鼠、豚鼠血清进行了检测，显示出阳性结果（资料没有显示）。该半套式 PCR 方法和 DNA 斑点杂交法尚需进一步在临床标本中加以应用和考验。

参考文献：

[1] 俞树荣 编著. Q 热的病原与防治[M]. 重庆：科学技术出版社重庆分社，1990. 68.

[2] Stein A, Kruszewska D, Goouvernet J, *et al*. Study of the 16S-23S ribosomal DNA internal spacer of Coxiella burnetii[J]. Eur J Epidemiol, 1997, 13(4): 471－475.

[3] Frazier M E, Mallavia L P, Samuel J E, *et al*. DNA probes for the identification of Coxiella burnetii strains[J]. Ann N Y Acad Sci, 1990, 590: 572－581.

[4] Stein A, Raoult D. Detection of Coxiella burnetii by DNA amplification using polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1992, 32(9): 2 462－2 466.

[5] 余 全，俞树荣. 用 DNA 探针检出 Q 热立克次体[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，1994，14(5)：349－351.

（编辑 潘式文）

（上接 1103 页）

本病国外报道 Hp 感染率高达 92%，显著高于一般人群的 50% ~ 60%。最近，Morgner 等[3]总结国外 12 篇文献近 400 例资料，表明约 80% 早期低度恶性胃 MALT 淋巴瘤在根除 Hp 后可获得完全缓解，这也是目前唯一能够通过药物治愈的消化道恶性肿瘤。本组 8 例的病理切片中均发现有 Hp 的存在，也说明重庆地区胃 MALT 淋巴瘤的发生可能与 Hp 感染有关。

本病术前诊断困难、误诊率高。本组钡餐诊断率仅 16.7%，胃镜加活检诊断率仅 50%。分析本组的内镜下表现，凡范围广泛的溃疡或糜烂等病变，尤其伴周围粘膜皱襞明显增粗、增厚者，就应想到本病。

本病对化疗及放疗均敏感，目前多主张采取以手术为主的综合疗法。手术切除后联合化疗和/或放疗可提高生存率。对 Hp 相关性胃 MALT 淋巴瘤，根除 Hp 则是治疗中必不可少的重要措施。

关键词：胃粘膜相关淋巴组织；淋巴瘤
中图法分类号：R733.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] Go M F, Smoot D T. *Helicobacter pylori*, gastric MALT lymphoma, and adenocarcinoma of the stomach[J]. Semin Gastrointest Dis, 2000, 11(3): 134－141.

[2] 朱人敏，何小平，王 琳 等. 胃粘膜相关淋巴组织淋巴瘤临床与内镜表现特征[J]. 中华消化内镜杂志，2001，18(1)：3－5.

[3] Morgner A, Bayerdorffer E, Neubauer A, *et al*. Malignant tumors of the stomach. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori*[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2000, 29(3): 593－607.

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net