

鸚鵡热衣原体 *rrn* 操纵元序列双重 PCR 检测方法的建立

郝永新 赵德明 杨建民 何诚

(中国农业大学 动物医学院, 北京 100094)

摘要 为快速检测鸚鵡热衣原体,基于鸚鵡热衣原体 *rrn* 操纵元序列(即 16S-23S rRNA 间隔区基因和 23S rRNA 基因序列)建立了双重 PCR 法,对 100 份临床标本进行检测,并与单一 PCR 法、免疫荧光法进行了比较。结果显示:双重 PCR 法特异性与敏感性均高于单一 PCR 法、免疫荧光法。双重 PCR 平均阳性检出率为 83.4%~97.2%,敏感性为 500 fg/ μ L。结果显示鸚鵡热衣原体 *rrn* 操纵元序列双重 PCR 法不仅能够检测衣原体和 非衣原体感染,而且能够同时实现鸚鵡热衣原体检测和鉴定,从而克服了单一引物应用时的不足,为未来鸚鵡热衣原体病分子流行病学调查及临床早期诊断提供了有效的检测手段。

关键词 鸚鵡热衣原体; *rrn* 操纵元序列; 双重 PCR; 检测

中图分类号 S 854.43

文章编号 1007-4333(2005)05-0065-04

文献标识码 A

Development of Duplex PCR method for detection of *rrn* operon sequence from *Chlamydia Psittaci*

Hao Yongxin, Zhao Deming, Yang Jianmin, He Cheng

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract To set up a method for rapid detection of *Chlamydia psittaci*, a duplex PCR method was developed according to the sequences of the *rrn* operon sequence of *Chlamydia psittaci*, that is, 16S ribosomal DNA sequence and 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences. The results of detection from clinical samples ($n = 100$) by duplex PCR were compared with those by general PCR and immune fluorescence method. It was found that the specificity and sensitivity of duplex PCR were higher than that of both general PCR and immune fluorescence method. The average positive rate of duplex PCR was 83.4 - 97.2 percent and the lowest detection level was 500 fg/ μ L. Through a single procedure of duplex PCR, not only *Chlamydia* or non-*Chlamydia* could be distinguished, but *Chlamydia psittaci* could be identified as well. The duplex PCR is rapid, reliable and simple and provides an effective method for the epidemiology investigation and early diagnosis of *Chlamydia psittaci*.

Key words *chlamydia psittaci*; the *rrn* operon sequence; duplex PCR; detection

鸚鵡热衣原体 (*Chlamydia psittaci*, Cps) 是专性真核细胞内寄生微生物,作为重要的人畜共患病病原菌愈来愈受到研究者的重视^[1]。鸚鵡热衣原体的宿主广泛且致病多样,可广泛感染畜禽、野生动物和人类,并由此导致不同的临床症状和病理变化。许多人和动物在感染后常呈隐性经过和无症状带菌状态,反复感染和与其他病原菌的混合感染也较为多见,这更增加了临床诊断工作的难度,因而急需建立一种简便、准确的临床快速诊断方法^[2~4]。

目前,国外学者已成功应用衣原体的主要外膜蛋白、热休克蛋白、脂多糖、16S 和 23S rRNA 基因的全长序列为靶基因序列,通过运用 PCR、DNA 杂交技术及 Real-time PCR 等技术实现衣原体的检测^[5~8]。国内对衣原体的检测主要依据病原体分离和/或血清学检查^[2,9],病原分离主要包括鸡胚接种、细胞培养和动物回归试验,这些方法主要依据特异性单克隆抗体免疫荧光(酶)反应确定病原,或依据染色后观察特征性的包涵体^[9],其程序复杂,结

收稿日期: 2005-02-17

作者简介: 郝永新,硕士研究生; 何诚,副教授,通讯作者,主要从事禽病研究, E-mail: hecheng@cau.edu.cn

果判定时常带有主观性且敏感性受到限制,不宜于临床快速诊断^[10]。血清学检查对早期感染的检出效果不理想。因此,本研究旨在建立一种早期、快速、简便检测鸚鵡热衣原体的方法,进而对及早诊治、及时限制和预防该病的发生传播提供有效途径。

1 材料与方法

1.1 标准菌株与临床样本

鸚鵡热衣原体、肺炎衣原体和沙眼衣原体标准株分别购自中国农业科学院兰州兽医研究所和中国兽药监察所。经临床诊断结合细胞培养、鸡胚接种及单克隆抗体免疫荧光染色试验确诊为鸚鵡热衣原体的肉鸡阳性肺组织和鸡胚培养物,各50份,阴性样本各10份。

1.2 主要试剂

细菌基因组提取试剂盒购自天为时代公司,蛋白酶K为德国Merk公司产品,Ex-Taq DNA多聚酶及其他试剂均购自华美生物工程公司。免疫荧光试剂盒,由北京军事医学科学院微生物流行病学研究所提供。

1.3 标准菌株的繁殖与检测样本处理

1) 鸡胚接种。无菌条件下,分别将鸚鵡热、肺炎和沙眼衣原体标准株冻干粉各5mg溶于5mL灭菌生理盐水中,充分混匀,接种7日龄SPF鸡胚的卵黄囊腔,0.2mL/枚,37℃孵育,逐日观察鸡胚病变。取4~6d死亡的鸡胚卵黄囊,分别用姬姆萨和荧光标记抗衣原体单克隆抗体染色,镜检包涵体。阳性卵黄囊于-20℃保存。

2) 鸡胚培养物样本处理。鸡胚卵黄囊膜无菌充分研磨后,反复冻融3次,充分释放衣原体,12000r/min离心30min;沉淀加入500μL TE悬浮,加入50μL 10%(质量分数) SDS,10μL 蛋白酶K(200μg/mL),用手轻摇混匀,75℃水浴15~20min,至液体清亮。按照细菌组织基因组提取试剂盒说明提取DNA。

3) 自然病例样本处理^[8]。经临床诊断结合细胞培养和鸡胚接种及单克隆抗体免疫荧光染色等方法确诊的阳性、阴性样本处理及DNA制备:无菌取待检样1g,研磨成20%(质量分数)悬液,提取DNA,方法同2)。分光光度计测定DNA含量,适量稀释后用于PCR。

1.4 引物的设计与合成

根据鸚鵡热衣原体 *rrn* 操纵元序列即 16S-23S

rRNA 间隔区基因和 23S rRNA 基因序列(序列号为:AB001778),分别设计合成2对引物:23S rRNA 基因序列针对衣原体属特异性:F1:5'-gAT gCC Tgg CAT TgA TAg gCg ATg AAg gA-3';R1:5'-Tgg CTC TCA TgC AAA Agg CA-3',扩增片段为627bp。16S rRNA 与 23S rRNA 间隔区序列针对鸚鵡热衣原体种特异性:F2:5'-CCC AAg gTg Agg CTg ATg AC-3',R2:5'-CAA ACC gTC CTA AgA CAg TTA-3',扩增片段为111bp。由三博远志生物工程技术公司合成。

1.5 PCR 扩增及产物检测

1) 单一 PCR 法。23S rDNA PCR 扩增与 16S-23S rDNA PCR 扩增,按照文献[4]操作。

2) 双重 PCR 法。设 Cps 标准株模板为阳性对照,等体积无模板为阴性对照。反应体系 50μL,10×PCR 缓冲液 5μL,25mmol/L MgCl₂ 3μL,2.5mmol/L dNTP 混合物 4μL,引物包括 F1(25mol/L) 0.25μL、R1(25μmol/L) 0.25μL、F2 0.25μL、R2 0.25μL、DNA 模板 0.5μL,Ex-Taq 酶 0.5μL,去离子水 36μL。

反应程序:94℃ DNA 变性 5min,94℃ 30s,56℃ 30s,72℃ 1min 扩增 30 个循环,72℃ 延伸 7min。

反应结束后,4μL PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳 15~20min,并用凝胶成像系统拍照记录实验结果。

1.6 PCR 结果判定

627 和 111bp 处同时可见清晰条带,判定为鸚鵡热衣原体阳性,若只有 1 条 627bp 清晰条带出现,判定为衣原体阳性。

1.7 统计学分析

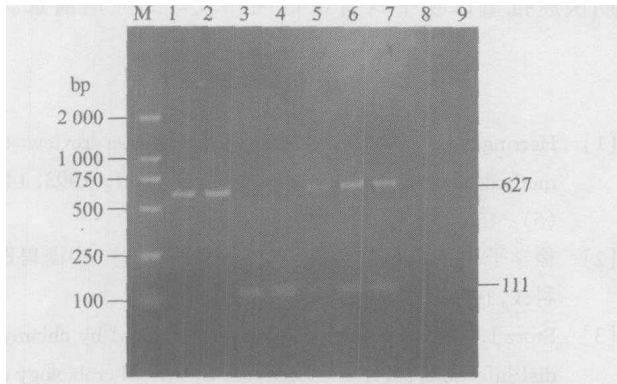
为了确定该检测方法的可重复性,测定了组间重复的精确性。组间重复性检测通过对鸚鵡热衣原体感染的阳性肺脏、鸡胚培养物及阴性标本,各 10 份,分别进行双重 PCR 和免疫荧光重复测定 3 次。以其检测 $\bar{x} \pm sd$ 表示变异情况。用 SPSS 10.0 软件对其数据进行统计分析。

2 结果

2.1 *rrn* 操纵元序列双重 PCR 扩增结果

在双重 PCR 反应中(图 1),沙眼和肺炎衣原体只扩增出 1 条 627bp 目的带,而鸚鵡热衣原体标准株、阳性肺脏和鸡胚培养物样本则可同时扩增出 627 和 111bp 的 2 条特异性 DNA 带;因而,通过 1

次反应不仅能够快速区分衣原体和 非衣原体感染, 而且实现了鸚鵡热衣原体的检测和鉴定。



1. 沙眼衣原体标准株; 2. 肺炎衣原体标准株; 3. 临床样本肺脏 16S~23S rDNA 单一 PCR 扩增结果; 4. 鸡胚培养物 16S~23S rDNA 单一 PCR 扩增结果; 5~6. 临床样本肺脏和鸡胚培养物; 7. 鸚鵡热衣原体标准株; 8. 阴性对照; 9. *E. Coli* 对照; M. Marker 2000

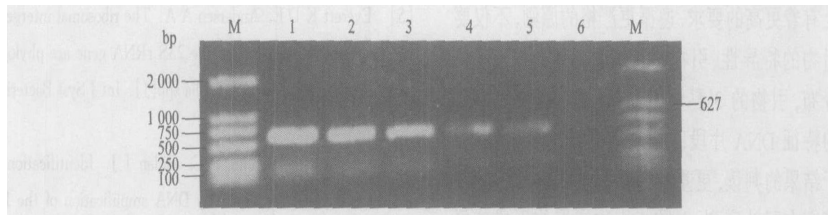
图 1 *rrn* 操纵元序列双重 PCR 扩增结果
Fig. 1 Duplex PCR amplification of the *rrn* operon sequence of *Chlamydia*

2.2 *rrn* 操纵元双重 PCR 扩增的特异性

以常见的几种衣原体标准株作对照进行扩增, 结果表明: 采用 23S rDNA PCR 扩增体系, 所有衣原体均扩增出 1 条 627 bp 的 DNA 带, 因此, 此扩增体系直接扩增不能鉴定衣原体到种, 而是具有属的特异性。采用 16S-23S rDNA 间隔区序列 PCR 扩增体系, 可把衣原体鉴定到种, 只有鸚鵡热衣原体可得到特异性 111 bp 的目的带。在一个反应体系中, 采用双重 PCR 法, 鸚鵡热衣原体标准株与临床样本均可同时扩增到 627 和 111 bp 的 DNA 带, 说明 *rrn* 操纵元序列双重 PCR 扩增鸚鵡热衣原体的特异性。

2.3 *rrn* 操纵元双重 PCR 扩增的敏感性

纯化的鸚鵡热衣原体临床样 DNA 用光密度法测定质量浓度为 880 ng/ μ L。用 1 \times TE 稀释成 5 ng/ μ L, 500、50 和 5 pg/ μ L, 500 和 50 fg/ μ L, 25 μ L PCR 扩增体系取稀释好的 DNA 溶液各 3 μ L, 扩增敏感性为 500 fg/ μ L (图 2)。



1. 5 ng/ μ L; 2. 500 pg/ μ L; 3. 50 pg/ μ L; 4. 5 pg/ μ L; 5. 500 fg/ μ L; 6. 50 fg/ μ L; M. Marker 2000

图 2 *rrn* 操纵元双重 PCR 扩增的敏感性

Fig. 2 Sensitivity of the *rrn* operon sequence of *Chlamydia*

2.4 双重 PCR 法与单一 PCR 法、免疫荧光法检测结果比较

对鸚鵡热衣原体感染的阳性肺脏、鸡胚培养物及阴性标本各 10 份, 分别进行双重 PCR、单一 PCR

和免疫荧光测定, 结果见表 1。可看出, 三者的阳性检出率分别为 83.4%~97.2%、82.1%~95.1% 和 71.3%~80.7%, *rrn* 操纵元序列双重 PCR 法检测的阳性率均高于单一 PCR 法和免疫荧光法。

表 1 双重 PCR 法与免疫荧光法检测结果比较 ($\bar{x} \pm sd$)

Table 1 Results of detection from Cps sample by duplex PCR in comparison with general PCR and immune fluorescence method

检测物	双重 PCR		单一 PCR		免疫荧光	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
肺脏	9.07 \pm 0.69		8.75 \pm 0.56		7.70 \pm 0.79	
鸡胚培养物	9.00 \pm 0.69	1.93 \pm 0.91	8.97 \pm 0.73	3.1 \pm 0.88	7.50 \pm 0.14	4.80 \pm 1.61
平均值	9.03 \pm 0.69	1.93 \pm 0.91	8.86 \pm 0.65	3.1 \pm 0.88	7.60 \pm 0.47	4.80 \pm 1.61

3 讨论与结论

1) *rrn* 操纵元序列即 16S-23S rRNA 间隔区基因和 23S rRNA 基因序列,是近年来发展起来的一种崭新的分子水平上的菌种分类和鉴定方法,同时也为临床早期诊断提供了新的检测手段^[3,6]。本研究首次将 23S rDNA 与 16S-23S rDNA 2 个单一 PCR 扩增体系相结合,用于鹦鹉热衣原体的检测,兼顾了二者的优点,克服了各自的不足,在 1 个反应管中 1 次反应可同时检测衣原体和非衣原体感染,也可用于鹦鹉热衣原体的鉴定。该方法的最低检出限为 500 fg/ μ L,阳性检出率为 83.4%~97.2%,比单一 PCR 法和免疫荧光法的阳性检出率有所提高。这表明建立的双重 PCR 法具有较高的特异性和敏感性。

2) 双重 PCR 是在单一 PCR 技术基础上改进、发展起来的,其引物为双重复合引物,但并非是简单地把 2 种特异性引物相互混合而成,在引物的选取、设计上有着更高的要求,遵循更严格的原则,不仅要考虑引物的特异性、引物的长度、G+C 量、碱基的随机分布,引物的 3' 黏性末端,还要考虑引物引导扩增的特征 DNA 片段间分子量要有一定的差别,以利于结果的判读,更重要的是引物自身和引物之间不能存在互补序列,以防止引物二聚体形成或复性^[10]。本研究中对 2 对引物的选取、设计时充分考虑到了上述要求,不但避免了因衣原体属和鹦鹉热衣原体种的差异而造成的漏检,而且建立的双重 PCR 体系,还具有单一 PCR 的全部优点和特异性、敏感性,能够取代单一 PCR 来进行衣原体和鹦鹉热衣原体检测,并且在不增加成本和工作量的前提下,可同时检测几种病原体,提高了工作效率。该方法不失为实验室诊断和病原学分子流行病学调查的有效手段。

3) 由于临床上鹦鹉热衣原体反复感染非常普遍,因此血清学检测不适用于早期诊断,同时,鹦鹉热衣原体继发或混合感染其他病原菌时,常常造成

临床上的漏诊和误诊。本研究建立的双重 PCR 方法克服了上述缺点,操作简便、省时省力,在临床早期快速批量诊断中具有可行性和较好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Herring A J. Typing *Chlamydia psittaci*-a review of methods and recent findings [J]. *Br Vet J*, 1993, 149 (5): 455-475
- [2] 徐学平. 畜禽鹦鹉热衣原体的研究进展[J]. *中国兽医科技*, 1990, 10 (2): 13-15
- [3] Storz J. Overview of animal diseases induced by chlamydial infections [A]. In: Barron A L, ed. *Microbiology of Chlamydia*. Boca Raton, [C]. Florida: CRC Press, 1988. 167-192
- [4] Guillermo Madico, Thomas C Quinn, Fens Boman, et al. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA Genes[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 38:1085-1093
- [5] Everett K D E, Andersen A A. The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47:461-473
- [6] Gaydos C A, Quinn T C, Eiden J J. Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene[J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30:796-800
- [7] Gaydos C A, Palmer L, Quinn T C, et al. Phylogenetic relationship of *Chlamydia pneumoniae* to *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* as determined by analysis of 16S ribosomal DNA sequences[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43: 610-612
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002
- [9] Schlossberg D. *Chlamydia psittaci* (psittacosis) [M]. 1995. 1693-1696
- [10] Boman J, Gaydos C A, Quinn T C. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:3791-3799