文章编号: 1001-0580(2008)09-1111-03　中图分类号: Q 503　文献标志码: A　【实验研究】

嗜肺军团菌荧光定量 PCR 检测

朱水荣[1], 张政[1], 卢亦愚[1], 任红宇[2], 扬仕贵[1], 高晓萍[1]

摘　要: 目的　建立特异、快速、敏感的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法, 用于检测嗜肺军团菌 *mip* 基因。方法　嗜肺军团菌及其他军团菌 DNA 模板来自中国疾病预防控制中心呼吸道室, 嗜肺军团菌地方株及其他对照株由本中心菌种室供给。利用嗜肺军团菌 *mip* 基因保守序列设计引物和 TaqMan 探针, 对其进行筛选, 同时对荧光定量 PCR 反应条件和反应体系进行优化, 并对嗜肺军团菌、非嗜肺军团菌及其他细菌进行检测, 验证该方法的特异性、敏感性、重复性等。结果　该方法在检测多株嗜肺军团菌时, 均出现阳性信号, 而对非嗜肺军团菌和其他细菌则未有阳性扩增结果出现。检测灵敏度达 10 个拷贝/反应, 从菌株核酸的提取至检测完成仅需 2 h 左右, 可减少常规 PCR 操作的污染机会。结论　TaqMan 荧光定量 PCR 方法可定量检测嗜肺军团菌, 具有特异性高、快速、敏感等特点, 适于外环境污染源状况的调查及应急事件的快速定量检测。

关键词: 嗜肺军团菌; *mip* 基因; TaqMan 探针; 荧光定量 PCR

Detection of *Legionella pneumophila* by using fluorescence quantitative PCR

ZHU Shui-rong, ZHANG Zheng, LU Yi-yu, et al. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention (Hangzhou 310051, China)

Abstract: Objective　To develop a specific, rapid and sensitive fluorescence quantitative PCR assay for detection of *Legionella pneumophila*. **Methods**　The genomic DNA of *Legionella pneumophila* and *Legionella spp* was from Chinese Center for Disease Control and Prevention, and then the local strains of *Legionella pneumophila* and other control strains were obtained from Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention. The primers and TaqMan probe were designed in conservative sequence of *Legionella pneumophila mip* gene, and then the PCR condition and the reaction system were optimized simultaneously. The specificity, sensitivity, reproducibility of the assay were evaluated. **Results**　This assay had high sensitivity and specificity for detecting *L. pneumophila* but not to the other *Legionella spp*. and other strains, the sensitivity of this assay was 10 copies/ reaction. The whole process from extraction of genomic DNA of strains to assessment of the results could be done in about 2 hours. It was a simple, convenient assay with good reproducibility. Furthermore, this method can also decrease the probability of contamination. **Conclusion**　The fluorescence quantitative PCR provides a specific, rapid and sensitive method for quantitative detection of *L. pneumophila*. It is helpful for the rapid detection of environment source of pollution, emergency and clinical samples.

Key words: *Legionella pneumophila*; *mip* gene; TaqMan probe; fluorescence quantitative PCR

军团菌在自然界广泛存在并可导致高病死率, 已成为世界性的公共卫生问题, 引起普遍关注。而传统的实验室诊断主要依靠细菌培养、生化反应和血清学鉴定, 所耗时间比较长, 难以适应快速控制疫情的要求。因而, 建立一种快速、敏感和准确的实验室检测方法显得尤为必要。TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法操作简单、快捷高效、安全, 可定量, 具有较高的灵敏度和特异性, 抗污染性强, 现已成功应用到多个领域[1-4]。鉴于 *mip* 基因表达的产物 *mip* 蛋白是迄今所公认的嗜肺军团菌的主要毒力因子之一, 为嗜肺军团菌所特有[5,6]。本研究根据嗜肺军团菌的 *mip* 基因设计引物和探针, 成功建立嗜肺军团菌荧光定量 PCR 方法。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　材料

(1) 菌株: 嗜肺军团菌(LP1, LP3, LP4, LP5, LP6, LP7, LP8, LP9, LP10, LP11, LP12, LP13)、博杰曼军团菌、长滩军团菌、杜莫夫军团菌、高尔曼军团菌、米克戴德军团菌、约旦军团菌 DNA 模板(中国疾病预防控制中心呼吸道室), 部分嗜肺军团菌(地方株)、O157: H7 大肠埃希菌、伤寒沙门菌、福氏 2a 志贺菌(本中心菌种室)。(2) 培养基: 军团菌基础培养基(BCYE)、军团菌选择培养基(GVPC)(广州乐通泰试剂有限公司); 普通营养琼脂培养基(杭州天和微生物试剂有限公司)。(3) 质粒标准品: 将 PCR 扩增的产物克隆至 pMD18-T 载体上, 挑取阳性克隆转化至 DH5α 大肠埃希菌中, 增菌后提取质粒 DNA 进行测序以鉴定插入序列, 并测定质粒 DNA 浓度进行拷贝数的换算。(4) 主要试剂与仪器: DNA 提取试剂盒、PCR 及荧光定量 PCR 反应试剂(TAKARA 宝生物(大连)工程有限公司); Mastercycler 梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司); Mx3000P 荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagne 公司); 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司); 水浴摇床(江苏金坛江南仪器厂 SHA-C); 浊度仪 Densimat bioMerieux、血平板等(法国梅里埃生物公司; 军团菌胶乳凝集试剂盒、磁珠等(广州乐通泰试剂有限公司)。(5) 引物与探针: 针对嗜肺军团菌 *mip* 基因保守序列, 设计引物和特异性探针, 由 TAKARA 公司合成, 探针 5′ 端标记报告荧光染料 6-Carboxyfluorescein(FAM), 3′ 端标记淬灭荧光染料 TAMRA。PCR 产物长度为 147bp。上游引物 5′-GCTTGCAATGTCAACAGG-3′; 下游引物 5′-CCTTTAGCCATTGCTTCG-3′; 探针 5′(FAM)-CTGCAACGGATGCCACATCATTA(TAMRA)-3′。

1.2　方法

1.2.1　菌株培养　部分嗜肺军团菌(地方株)划种于 GVPC/BCYE 平板上培养 3 d 后, 挑取单个菌落制备模板。O157: H7 大肠埃希菌、伤寒沙门菌、福氏 2a 志贺菌均划种于普通营养琼脂平板上培养, 挑取单个菌落制备模板。

1.2.2　模板制备　采用热裂解法和 DNA 试剂盒提取法制备 DNA 模板。热裂解法: 挑取单个菌落于装有 100 μl DNA 抽

作者单位: 1. 浙江省疾病预防控制中心微生物所, 杭州 310051; 2. 中国疾病预防控制中心
作者简介: 朱水荣(1966-), 女, 安徽人, 副主任技师, 本科, 主要从事微生物检验工作。

提液的 eppendorf 管中，放于裂解仪中 100℃ 10 min 后，12 000 r/min离心 5 min，取上清，4℃保存备用；DNA 试剂盒提取法按操作说明书进行。

1.2.3 嗜肺军团菌的稀释与计数 取菌量为 5×10^7 cfu/ml 的 LP1 型军团菌，用双蒸水进行 10 倍稀释，从 10^{-3}，10^{-4}，10^{-5}，10^{-6}，10^{-7}稀释液中吸取 100 μl 到 BCYE 培养基上，用 L 棒及时涂布均匀，每个稀释度做 3 个平皿，于含 5% CO_2 的培养箱，37℃，培养 3~ 5 d 后进行计数。同时再取每个稀释度的菌液各 1 ml，制成 100 μl 的模板，用做 PCR 敏感性试验。

1.2.4 PCR 扩增反应 (1) 定性 PCR 扩增体系和反应条件：总反应体系为 25 μl，包括 Taq 酶(5U/μl) 0.125 μl，10× PCR buffer(Mg^{2+} free) 2.5 μl，Mg^{2+} 1.5 μl，dNTPs 2 μl，上、下游引物各 0.5 μl，模板 2 μl，用 ddH_2O 补足至 25 μl。反应条件为 94℃ 5 min，94℃ 35 s，55℃ 35 s，72℃ 75 s，72℃ 3 min，35 个循环。用 2% 琼脂糖进行凝胶电泳。(2) 荧光定量 PCR 扩增体系和反应条件：总反应体系为 25 μl，包括 premix EX Taq 12.5 μl，上游引物 0.25 μl，下游引物 0.25 μl，探针 0.5 μl，模板 DNA 2 μl，ROX Reference Dye Ⅱ 0.5 μl，用 ddH_2O 补足至 25 μl。反应条件为 95℃ 10 s，1 个循环；95℃ 5 s，60℃ 20 s，40 个循环。(3) 引物与探针最佳浓度优化：以相同 DNA 浓度的 LP1 菌为 PCR 反应模板，引物浓度(20 μmol/L) 不变，将引物量从 0.15~ 0.45 μl 以 0.1 μl 递增；探针浓度(10 μmol/L) 不变，探针量从 0.3~ 0.7 μl 以 0.1μl 递增；采用矩阵法优选引物和探针的最佳浓度。

1.2.5 荧光定量 PCR 方法验证 (1) 敏感性检验：将上述活菌不同稀释度(嗜肺军团菌 LP1 型菌株) 进行方法敏感性评价同时，另将质粒标准品作 10 倍系列稀释，取终浓度为 105 ~ 10copies/反应的质粒 DNA 5 个样品同样进行方法敏感性检测，并绘制标准曲线。(2) 特异性检验：对 12 株嗜肺军团菌、6 株非嗜肺军团菌及 3 株其他菌株提取 DNA，用荧光定量 PCR 反应系统进行检测，验证方法的特异性。(3) 重复性检验：取 3 个不同 DNA 浓度样品，对每个浓度样本作 3 个重复检测，计算 Ct 值(Ct 值含义：每个反应管内荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。)变异系数验证检测体系的稳定性。

1.2.6 PCR 阳性结果判定 (1) 常规 PCR 阳性结果判定：电泳条带明显者判定为阳性，不明显者判定为阴性；(2) 荧光定量 PCR 阳性结果判定：荧光定量 PCR 检测以 Ct 值< 37 并且扩增曲线呈 S 型为阳性判定原则。其中 Ct 值< 35 且扩增曲线良好可直接判定为阳性，Ct 值 35~ 37 之间需要重复实验，2 次实验均能得到良好 S 型扩增曲线方可判定为阳性。

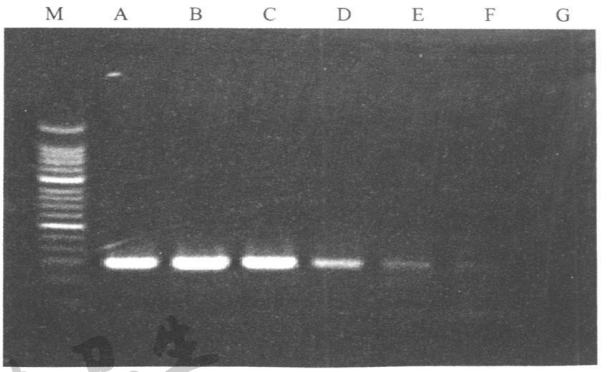
1.2.7 未知样品检测 对来自湖州的 15 份冷却塔水样分别采用传统分离培养法、普通 PCR 法和荧光定量 PCR 法进行检测。

2 结 果

2.1 *引物与探针浓度优化* 上游引物和下游引物的量分别为 0.15，0.25，0.35，0.45 μl；探针量为 0.3，0.4，0.5，0.6，0.7 μl。模板扩增结果可见，探针量为 0.5 μl，引物量为 0.35 μl 时，Ct 值最小，荧光强度增加值(△Rn) 较高，探针量为 0.6 μl，引物量为 0.45 μl 时，荧光强度增加值(△Rn) 最高，Ct 值较小。综合考虑，本实验采用引物量为 0.35 μl，探针量为 0.5 μl。

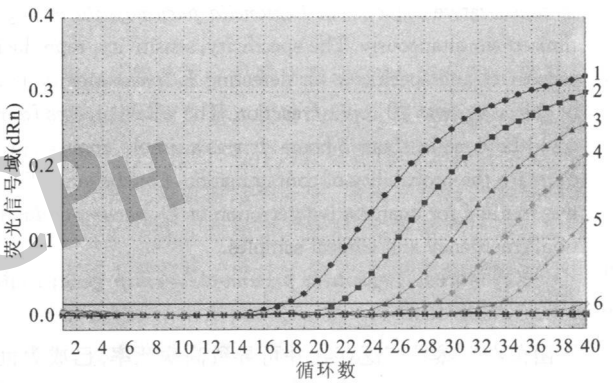
2.2 *方法特异性* 利用该法对嗜肺军团菌、非嗜肺军团菌以及其他菌株进行检测。结果表明，本实验体系对嗜肺军团菌表现良好的特异性，而对非嗜肺军团菌、其他菌株及所设置的阴性对照均呈阴性结果。

2.3 *方法敏感性* (1) 利用活菌进行评价：LP1 型菌株不同稀释度平皿培养结果显示，其中 10^{-4}~ 10^{-7}稀释度的平皿菌落数分别为 2364，680，52，10 cfu/ml。不同稀释度提取模板经常规 PCR 检测，其灵敏度为 680 cfu/ml，而荧光定量 PCR 检测灵敏度则为 10 cfu/ml。荧光定量 PCR 检测灵敏度比常规 PCR 方法高 68 倍(图 1、图 2)。



注：M：50bp marker；A：原稀释液；B：10^{-1}；C：10^{-2}；D：10^{-3}；E：10^{-4}；F：10^{-5}；G：10^{-6}(cfu)。

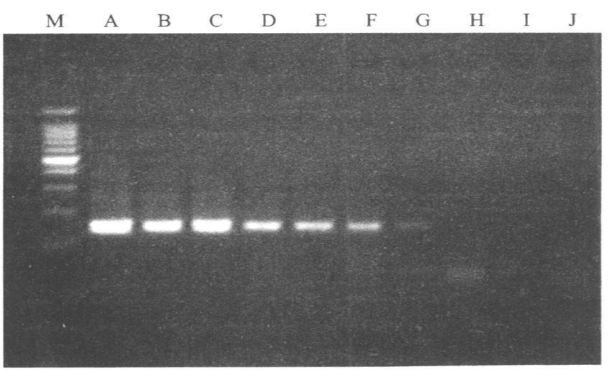
图 1 常规 PCR 检测活菌敏感性结果



注：1：10^{-2}；2：10^{-3}；3：10^{-4}；4：10^{-5}；5：10^{-6}；6：10^{-7}(cfu)。

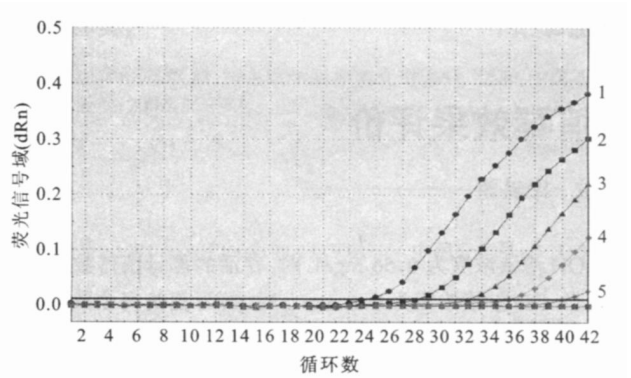
图 2 荧光定量 PCR 检测活菌敏感性结果

(2) 利用质粒标准品进行评价：将构建的质粒载体外标准品稀释成不同浓度，分别用常规 PCR 与荧光定量 PCR 进行检测。结果显示，荧光定量方法敏感性达到 10 copies/反应，比常规 PCR 方法灵敏度高 100 倍左右(图 3，图 4)。以荧光强度的对数值为横坐标，循环数为纵坐标作图，得到 1 条标准曲线：$Y = -3.614\times LOG(X) + 37.93$，扩增效率为 89.1%，RSq= 0.998(图 5)。



注：M：100bp marker；A：10^9；B：10^8；C：10^7；D：10^6；E：10^5；F：10^4；G：10^3；H：10^2；I：10(copies)；J：阴性对照。

图 3 常规 PCR 检测质粒标准品结果



注: 1: 10^5; 2: 10^4; 3: 10^3; 4: 10^2; 5: 10^1。

图 **4**　荧光定量 **PCR** 检测质粒结果

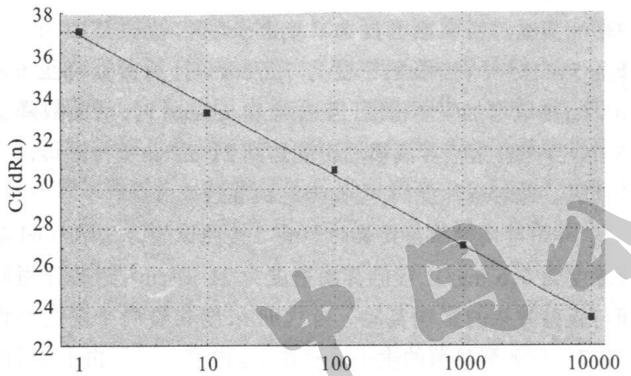


图 **5**　质粒标准曲线

2.4　方法重复性评价　对 10 倍系列稀释的 LP1 型嗜肺军团菌中的 3 个不同浓度梯度, 每个做 3 个重复试验, 计算各重复样品 Ct 值之间的变异系数, 分别为 0.420%, 0.385%, 0.286%, 结果显示, 该实验具有较好的重复性(图 6)。

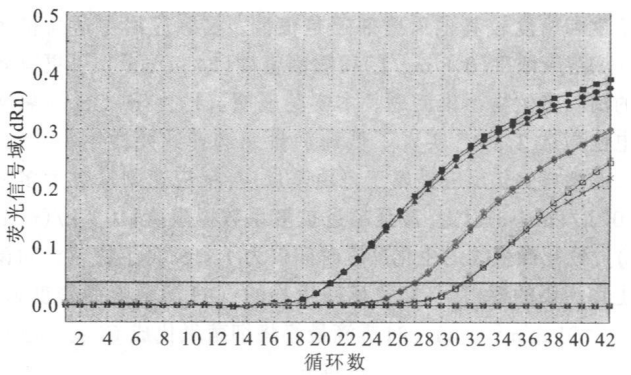


图 **6**　不同模板浓度重复性检测结果

2.5　未知样品不同方法检测结果　用 3 种方法分别对 15 份冷却塔水样进行检测。结果显示, 所有水样经传统分离培养法和普通 PCR 法检测均显示为阴性, 而荧光定量 PCR 法检测则显示有 3 份水样为阳性, 该结果经重复测定仍为相同结果。

3　讨　论

本研究针对嗜肺军团菌 *mip* 基因保守序列设计引物和探针, 并进行筛选, 得到最佳的引物与探针。利用矩阵配对法对反应体系中的引物、探针浓度进行优化, 取得了较为满意的结果。实验表明, 该方法特异性强, 与对照组菌株未发现有交叉反应; 灵敏度高, 分别用活菌计数法与质粒外标准品检测本方法灵敏度并与常规 PCR 法比较, 结果本实验得到的灵敏度分别为 10cfu/ml 和 10copies/反应, 与 Kate[5] 报道结果接近, 比常规 PCR 法高 68~ 100 倍; 稳定性好, 每个稀释度做 3 次重复, ct 值差异极小; 实行完全闭管式操作, 大大减少扩增产物污染的机会; 操作简单, 结果判别直观明了, 整个过程仅需 2 h。荧光定量 PCR 法检测效果好, 在 15 份冷却塔水样检测中, 检测出 3 份水样为阳性, 而传统分离培养法及普通 PCR 法检测均为阴性。本次试验中菌体 DNA 提取, 同时采用热裂解方法和试剂盒提取法, 经比较显示, 试剂盒提取法优于热裂解方法。试验中还用相同反应体系和反应条件针对不同型号定量扩增仪进行了扩增结果比较, 发现不同型号扩增仪其反应条件要求有所不同, 故试验时应根据实际情况进行调整。

本方法的建立, 不仅可以对医院和其他公共外环境水源的军团菌污染状况进行监测, 同时也有利于临床疑似病例的早期快速检测和鉴别诊断, 尤其是在对应急样本检测以及军团菌病暴发流行时提供实验室诊断方面, 为一种快速、敏感、特异、定量的有效方法。

参考文献

〔1〕 Kaisu Rantakokko-Jalava, Jari Jalava. Development of conventional and real-time PCR assays for detection of *Legionella* DNA in respiratory speciments[J]. Clinical Microbiology, 2001, 39(8): 2904-2910.

〔2〕 王小红, 王升启. 荧光定量 PCR 技术研究进展[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 2001, 23(1): 42- 45.

〔3〕 欧阳松应, 杨冬, 欧阳红生, 等. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 74- 76.

〔4〕 张立国, 张琚. 实时定量 PCR 技术的介绍[J]. 生物技术, 2003, 13(2): 39- 40.

〔5〕 Kate E Templeton, Sitha A Scheltinga, Peter Sillekens, et al. Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species[J]. Clinical microbiology, 2003, 40(9): 4016- 4021.

〔6〕 Deborah A, Wilson, Belinda Yen-Lieberman, et al. Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene[J]. Clinical microbiology, 2003, 41(7): 3327- 3330.

收稿日期: 2007-12-27　　(孔繁学编辑　李贵福校对)

科技论文基本撰写规范

参考文献　(1)以作者本人阅读的近年主要文献为主, 未公开发表的文章不能作为参考文献。(2) 一般论著类论文引用数量不超过 15 条, 综述、述评类文章不超过 20 条。(3) 引用的文献作者不超过 3 位时全部列出, 超过 3 位时, 只列出前 3 位作者, 其后加"等", 或者西文加"et al.", 日文加"他"。(4) 每条参考文献均须列出引用的起止页。(5) 在参考文献中的文题后要用方括号加注文献类型标识符: [M] 专著、图书、教科书; [J] 期刊; [C] 论文集、会议记录; [N] 报纸; [D] 学位论文; [R] 报告; [S] 专利; [DB] 数据库; [CP] 计算机程序; [EB] 电子公告; [MT] 磁带; [DK] 磁盘; [CD] 光盘; [OL] 联机网络。