



# 树鼩巴尔通体 PCR 方法的建立及初步应用

冯育芳, 邢进, 付瑞, 巩薇, 贺争鸣, 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050)

**【摘要】** 目的 建立有效的树鼩巴尔通体 PCR 检测方法, 并进行初步应用。方法 针对 NCBI 公布的巴尔通体序列设计 3 对引物, 通过对我国主要流行菌株的扩增实验来确定 1 对引物, 并进行体系优化、特异性和敏感性测试; 运用该 PCR 方法对 60 份树鼩样品进行检测, 阳性样本进行序列测定。结果 所建树鼩巴尔通体 PCR 检测方法特异性良好, 灵敏度较高( $2.0 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{mL}$ ), 60 份树鼩样本中有 15 份阳性样本, 通过序列测定证实树鼩巴尔通体感染率为 25%, 与扩增结果完全相符, 验证了该方法的可行性。结论 该方法的建立为树鼩巴尔通体的检测奠定了基础。

**【关键词】** 树鼩; 巴尔通体, 检测; PCR; 应用

**【中图分类号】** R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 06-0069-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.006.015

## Establishment and application of a PCR method for detection of *Bartonella* in tree shrew

FENG Yu-fang, XING Jin, FU Rui, GONG Wei, HE Zheng-ming, YUE Bing-fei

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**【Abstract】 Objective** To establish an effective PCR assay for detection of *Bartonella*, and application of this assay in tree shrew. **Methods** Sequence of *Bartonella* was obtained from NCBI Genbank. Three pairs of primers were designed based on this sequence. One pair of primers was determined through amplifying the major strains in China. Sixty tree shrew blood samples were tested with this PCR assay. The positive amplified fragments were sequenced to verify the reliability of this method. **Results** A PCR method for detection of *Bartonella* is successfully established, with a high specificity and the sensitivity was of  $2.0 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{mL}$ . Among the tested 60 blood samples, 15 positive cases were detected. Sequencing of the samples confirmed a 25% infection rate of *Bartonella* in the tree shrews, well consistent with the amplification results, and verified the applicability of this detection method. **Conclusion** The establishment of this method provides the basis for detection of *Bartonella* in tree shrew.

**【Key words】** Tree shrew; *Bartonella*, detection; PCR; Application

树鼩 (tree shrew, *Tupaia belangeri*), 树鼩科树鼩属的动物, 其许多分子和细胞结构近似于人类, 且对多种人类重要病毒易感, 可作为重要人类病毒动物模型<sup>[1]</sup>; 同时其在肿瘤学、内分泌学、神经生

物学、生殖生物学、免疫学等方面的作用也得到科研人员的肯定, 因此, 树鼩作为一种新型的实验动物资源正越来越受到重视<sup>[2, 3]</sup>。而微生物背景规范化检测是树鼩实验动物化的必备条件之一<sup>[2, 3]</sup>。

**【基金项目】** 实验动物新品种的种群建立与质量标准化研究(2011BAI15B01)。

**【作者简介】** 冯育芳(1981-), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 实验动物微生物检测, E-mail: fyt307@126.com。

**【通讯作者】** 岳秉飞(1960-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 实验动物遗传学。E-mail: y6784@126.com。

巴尔通体(*Bartonella*)是巴尔通体病的病原体,已证实能感染多种温血动物(犬、啮齿动物)和冷血动物(爬行类、两栖类)脊椎动物<sup>[4-6]</sup>。而且有研究报道云南鼠群中存在巴尔通体感染<sup>[8]</sup>。巴尔通体还可以通过白蛉、跳蚤、蜱、虱及恙螨等昆虫媒介传播给人,可引起人类卡瑞恩病、战壕热、猫抓病、心内膜炎、菌血症等疾病,是一种广泛存在的人兽共患病原<sup>[5]</sup>。国内外部分动物已要求检测该菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

伊丽莎白巴尔通体(*B. elizabethae*, 49227),汉赛巴尔通体(*B. henselae*, 49882)和拉汉姆巴尔通体(*B. grahamii*, Birtles, 700132)购自 ATCC,均为我国主要流行的巴尔通体菌株。用于特异性检测菌株分别为:肺链(31210),肺链(36001),乙链(32310),小鼠放线(49577),支败(19395),支败(58401),嗜肺(12555),嗜肺(35149),多杀(43137),鼠棒(65013),李斯特(54004),支原体(MP)和支原体(15531),均由本实验室保存鉴定。

### 1.2 引物设计

使用 primer 5 软件在巴尔通体保守序列区共设计 3 对引物,分别为引物对 1、引物对 2 和引物对 3,详细信息见表 1;Oligo 6 验证可用,并委托 Takara 公司合成。

### 1.3 样本采集及 DNA 提取

无菌采集树鼯 EDTA 抗凝血,吸取 300  $\mu$ L 用于提取 DNA;对照菌株纯培养后直接提取 DNA, DNA 提取使用 Qiagen 的 Dneasy Blood & Tissue Kit (Cat. No. 69504),详细操作根据产品说明书。

### 1.4 PCR 扩增体系

PCR 反应体系为 50  $\mu$ L,包括:10  $\times$  buffer 5  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, DEPC 水 29.75  $\mu$ L,引物各 2.5  $\mu$ L, Hs Taq 酶 2.5  $\mu$ L, DNA 5  $\mu$ L。通过实验对 PCR 反应条件进行优化,PCR 产物进行琼脂糖电泳检测,并送

Takara 公司进行序列测定。

### 1.5 特异性测定

将该理论扩增序列以及双向引物与 GenBank 上的序列进行 blast 比对,确定是否为特异性片段。另取本室保存的菌种(肺链(31210),肺链(36001),乙链(32310),小鼠放线(49577),支败(19395),支败(58401),嗜肺(12555),嗜肺(35149),多杀(43137),鼠棒(65013),李斯特(54004),支原体(MP)和支原体(15531))按上述方法提取 DNA,进行 PCR 扩增,检测不同细菌种间 PCR 扩增的特异性。

### 1.6 敏感性测定

对照菌株纯培养后,按上述方法直接提取 DNA,将提取的 DNA 倍比稀释为 20  $\mu$ g/mL、2  $\mu$ g/mL、2.0  $\times 10^{-1}$   $\mu$ g/mL、2.0  $\times 10^{-2}$   $\mu$ g/mL、2.0  $\times 10^{-3}$   $\mu$ g/mL、2.0  $\times 10^{-4}$   $\mu$ g/mL、2.0  $\times 10^{-5}$   $\mu$ g/mL、2.0  $\times 10^{-6}$   $\mu$ g/mL、2.0  $\times 10^{-7}$   $\mu$ g/mL、2.0  $\times 10^{-8}$   $\mu$ g/mL、2.0  $\times 10^{-9}$   $\mu$ g/mL、2.0  $\times 10^{-10}$   $\mu$ g/mL,用上述 PCR 方法进行测定,以确定其检测阈值。

## 2 结果

### 2.1 检测体系建立

为测试引物扩增效果及优化反应条件,将购自 ATCC 的巴尔通体(49227,49882 和 700132)作为阳性对照模板,通过实验对巴尔通体检测的引物进行筛选,结果见图 1,引物对 1 特异性不好,出现了杂带;引物对 3 敏感性差,扩增结果与目的片段长短不符合;而引物对 2 条带清晰,无杂带,与目的片段长短相符,测序结果证实为巴尔通体序列,最后确定引物对 2 为本实验较为合适的检测引物。

后通过温度梯度实验对 PCR 反应条件进行优化,最后确定最适反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,重复 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min (图 1)。

表 1 引物名称、序列及扩增片段

Tab. 1 Primers sequences

| Species                | Primers No. | Primer/Probe sequence <sup>a,b</sup>                       | Location of 5'<br>(Accession No.) |
|------------------------|-------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bartonella</i> spp. | 1           | 5'-GGGGACCAGCTCATGGTGG-3'<br>5'-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3'  | 380 bp                            |
|                        | 2           | 5'-CTTCGTTTCTCTTCTTCA-3'<br>5'-CTTCTCTCACAAATTTCAAT-3'     | 639 - 722 bp                      |
|                        | 3           | 5'-GCTAATCGTATTCGCGAAGAA-3'<br>5'-GCTGGTATTTCCAAYTGATCT-3' | 240 bp                            |

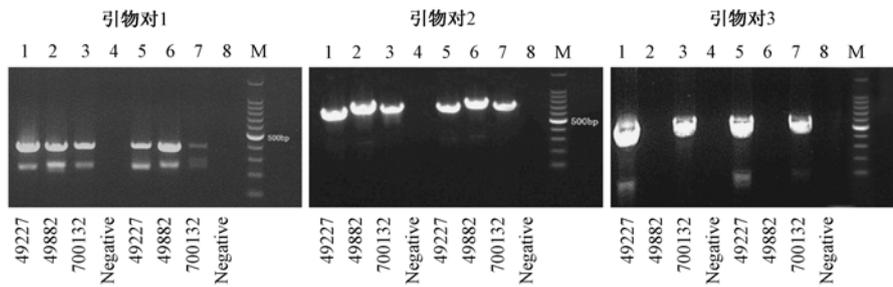


图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of the PCR with three primers

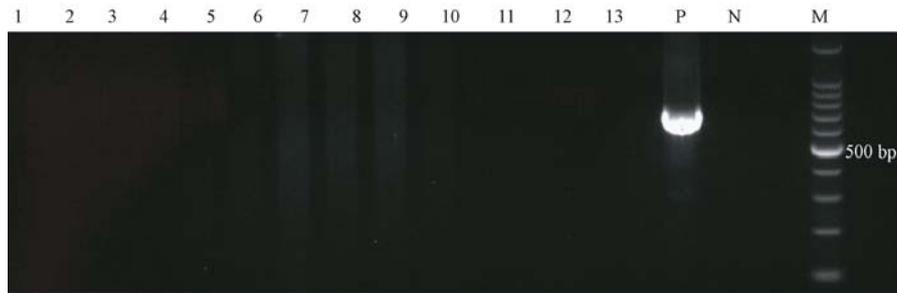


图 2 特异性试验

Fig. 2 The specificity test

2.2 特异性测定

图 2 为特异性测定结果,1 ~ 13 分别为肺链 (31210)、肺链 (36001)、乙链 (32310)、小鼠放线 (49577)、支败 (19395)、支败 (58401)、嗜肺 (12555)、嗜肺 (35149)、多杀 (43137)、鼠棒 (65013)、李斯特 (54004)、支原体 (MP) 和支原体 (15531),P 为阳性对照,汉赛巴尔通体 (49882),N 为阴性对照。结果表明,只有阳性对照出现阳性条带,即该 PCR 方法的特异性较高。

2.3 敏感性测定

为测定该 PCR 方法的敏感性,选取汉赛巴尔通体 (49882) 培养液 DNA 提取物,使用无 RNA 酶水做 11 个稀释度,1 ~ 11 为 10 倍系列稀释结果,从图 3 可见本实验方法最高可检测  $2.0 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ ,灵敏度较好。

2.4 初步应用

从云南采集 60 份树鼩血样,提取 DNA,并用优化后的 PCR 方法扩增特异性片段,以检测是否存在巴尔通体的感染。在这些样品中,共检出 15 个阳性标本 (图 4); 阳性样本送 Takara 公司进行测序,测序结果进行 blast 比对,显示这些样本均为巴尔通体阳性,充分验证了本检测方法的灵敏性和特异性。

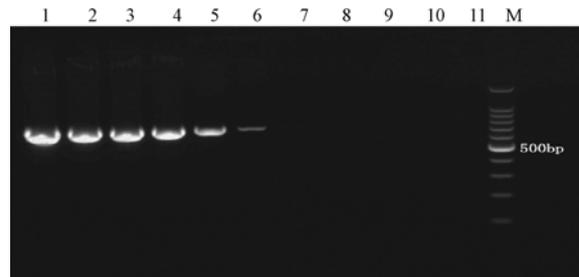


图 3 敏感性试验

Fig. 3 The sensibility test

3 讨论

树鼩作为近年来最有潜力的实验动物之一,正在进行系统的实验动物化工作<sup>[1-3]</sup>。云南是我国树鼩资源最丰富的地区,也是树鼩应用研究最发达的地区<sup>[2]</sup>。同时,云南也是我国最早进行巴尔通体系统研究的省份,为了解巴尔通体在云南省的流行情况,1999 年 10 月云南省地方病防治所与美国疾病预防控制中心虫媒传染病部联合在云南省的鼠群中开展调查,证实巴尔通体在云南人群和动物中普遍存在和广泛流行<sup>[8-10]</sup>。为了解巴尔通体在云南树鼩种群中的分布情况,本研究首先建立了一个巴尔通体 PCR 检测方法,并进行了特异性和敏感性测试,结果证明该方法的可行性。

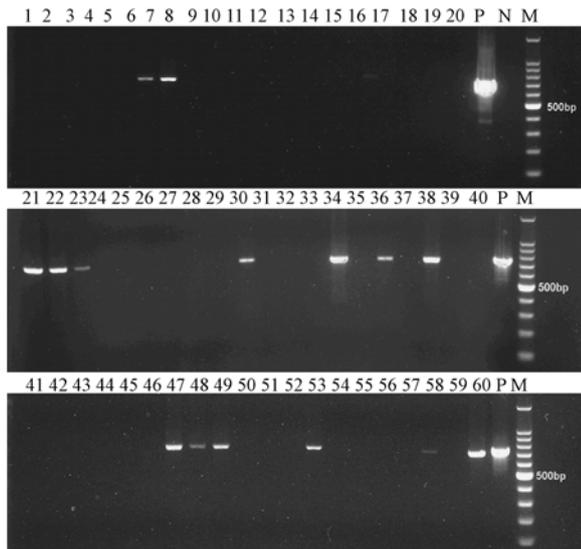


图 4 树鼩样本巴尔通体检测结果  
Fig. 4 The results of samples from tree shrew by the PCR assay

之前,大部分动物巴尔通体的调查研究使用的是培养方法<sup>[10]</sup>,该方法为细菌检测的经典方法,但操作繁琐,灵敏性低,时效性差;近来,随着分子生物学技术的普及,也有部分实验使用了 PCR 方法<sup>[11, 12]</sup>,但由于巴尔通体的高度流行及基因型别的多样性,有必要建立针对树鼩种群的 PCR 检测方法。

本实验首次在云南来源树鼩中检出巴尔通体,提示树鼩也存在巴尔通体的感染,而且相对其他动物,如姬鼠属(*Apodemus*) (62.2%, 28/45),家鼠属(*Rattus*) (41.5%, 27/65), 绒鼠属(*Eothenomys*) (18.8%, 3/16)<sup>[6]</sup>,树鼩巴尔通体属于中等程度流行(25%, 15/60),应该引起实验动物科技界足够的重视。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 黄晓燕,徐娟,孙晓梅,等. 树鼩在人类疾病动物模型中应用研究进展[J]. 实验动物科学 ISTIC. 2013, 30(2). 页码
- [ 2 ] 沈培清,郑红,刘汝文,等. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望[J]. 动物学研究. 2011, 32(1): 109 - 114.
- [ 3 ] 角建林,刘汝文,陈丽玲,等. 树鼩资源的开发利用与标准化研究——我国实验动物资源建设发展战略探讨[J]. 中国比较医学杂志. 2009, 19(7): 73 - 78.
- [ 4 ] Tahar Kernif, Meriem Aissi, Salah-Eddine, et al. Molecular Evidence of Bartonella Infection in Domestic Dogs from Algeria, North Africa, by Polymerase Chain Reaction (PCR) [J]. Am. J Trop. Med. Hyg, 83(2), 2010, pp. 298 - 300.
- [ 5 ] Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, et al. Rapid identification and differentiation of bartonella species using a single-step PCR assay. J Clin Microbiol, May 2000, p. 1717 - 1722.
- [ 6 ] 白文顺,夏春香,杨亮宇,等. 巴尔通体病研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(7): 20 - 23.
- [ 7 ] 叶曦,姚美琳,李国伟. 巴尔通体的流行病学[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(6): 467 - 470.
- [ 8 ] 白瑛. 首次证实巴尔通体在我国云南鼠群中流行[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(3): 5 - 9.
- [ 9 ] 杨发莲,白鹤鸣,杨慧,等. 云南放牧人群汉赛巴尔通体感染的血清学调查[J]. 中国热带医学, 2008, 8(6): 1011 - 1012.
- [ 10 ] 栗冬梅,俞东征,刘起勇,等. 云南省不同环境鼠形动物巴尔通体感染情况的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 25(11): 934 - 937.
- [ 11 ] 陈武,苏力,彭仕明. 华南虎源血巴尔通体的 PCR 检测[J]. 野生动物, 2010, 31(006): 301 - 304.
- [ 12 ] 姚美琳,罗炜,李国伟,等. 巴尔通体实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国热带医学, 2009, 9(10): 1963 - 1965.

[ 修回日期 ] 2014-02-27