



啮齿动物螺杆菌多重 PCR 检测方法的建立

李瑞娇¹, 冯洁², 谢建云², 胡建华², 高诚²

(1. 东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620;
2. 上海实验动物研究中心, 上海市实验动物质量监督检验站, 上海 201203)

【摘要】 目的 建立一种可同时检测肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌的多重 PCR 方法。方法 根据已公布的肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌 16SrRNA 基因序列设计三对特异性引物进行多重 PCR 并对反应条件进行优化。结果 三对引物能分别扩增出特异性的 417 bp、364 bp、324 bp 目的条带。最佳退火温度为 52℃, 镁离子浓度为 2.0 mmol/L, dNTP 浓度为 200 μmol/L, 引物浓度为 0.625 μmol/L。在此条件下多重 PCR 同时检测的肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌敏感度均为 10 fg。结论 本实验建立的多重 PCR 是一种敏感、特异、高效的方法, 为同时检测啮齿动物中肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌奠定了良好的基础。

【关键词】 肝螺杆菌; 胆汁螺杆菌; 啮齿类螺杆菌; 多重 PCR

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)12-0035-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.012.010

Establishment of a Multiplex PCR Procedure for Detection of Rodent Helicobacters

LI Rui-jiao¹, FENG Jie², XIE Jian-yun², HU Jian-hua², GAO Cheng²

(1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China;
2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai Quality Monitoring Center of Laboratory Animals, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To establish a multiplex PCR procedure for simultaneous detection of *H. hepaticus*, *H. bilis*, and *H. rodentium*, and to preliminarily verify its application value. **Methods** Three pairs of specific primers for the multiplex PCR procedure were designed according to published *H. hepaticus*, *H. bilis*, and *H. rodentium* 16S rRNA gene sequences, and the reaction conditions of the multiplex PCR were optimized. **Results** The results showed that all the three pairs of primers could be used to specifically amplify their target bands of 417 bp, 364 bp and 324 bp. The optimal annealing temperature was 52℃, the Mg²⁺ concentration was 2.0 mM, the dNTP concentration was 200 μM, and the concentration of primers was 0.625 μM. The sensitivity of the multiplex PCR for *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. rodentium* was 10 fg. **Conclusions** A sensitive, specific, efficient multiplex PCR procedure has been established in this study, providing a good foundation for the detection of *H. hepaticus*, *H. bilis*, and *H. rodentium*.

【Key words】 *H. hepaticus*; *H. bilis*; *H. rodentium*; multiplex PCR

啮齿动物螺杆菌 (rodent Helicobacter) 属革兰氏 阴性菌, 通常寄居于啮齿动物消化道内, 包括盲肠、

[基金项目] 上海市科技基金项目(11140901000)。

[作者简介] 李瑞娇(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: bingqiling0929@163.com。

[通讯作者] 冯洁, 女, E-mail: moyifj@163.com。

结肠以及肝胆管系统^[1]。自从 1992 年首次发现鼠型螺杆菌以来,目前已陆续分离到包括有肝螺杆菌 (*Helicobacter hepaticus*)、胆汁螺杆菌 (*Helicobacter bilis*)、啮齿类螺杆菌 (*Helicobacter rodentium*) 在内的至少十三种啮齿动物螺杆菌^[2]。啮齿动物螺杆菌的感染会严重影响实验动物的品质,其中肝螺杆菌可自然感染多个品系小鼠并直接导致急、慢性肝炎的产生,并对 A/JCr 小鼠肝癌发生有促进作用^[3],胆汁螺杆菌则易引起各种肠炎疾病,并与肝炎发生相关,例如多灶慢性肝炎^[4],而感染啮齿类螺杆菌也会导致小鼠肝炎、盲肠结肠炎等多种肠肝疾病,另外胆汁螺杆菌与啮齿类螺杆菌的同时存在,会引起 SCID 小鼠腹泻^[5]。因此,若误将感染螺杆菌的动物用于科研或生物安全性评价等试验中,较易引起实验数据混乱,对结果产生较为严重的干扰,甚至引发更严重的后果^[2]。

啮齿动物螺杆菌的诊断检测,目前有很多种方法,包括传统的分离培养法、ELASA、PCR 等^[6,7]。PCR 诊断是螺杆菌分子诊断最优势的方法,其因快速、敏感、特异等优点而得到广泛的应用,主要有普通 PCR、巢式 PCR、多重 PCR、荧光核酸酶 PCR 等^[8]。多重 PCR 是以普通 PCR 反应体系为基础,但升级为同时加入多对引物,同时扩增出多条目的片段,以达到同时检测多种病原体,快速、高效的新型方法^[9]。本实验旨在建立一种敏感、特异、高效的多重 PCR 方法,以达到可同时检出肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌的目的,为快速诊断提供良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒:分别包含肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌 16S rRNA 片段的三种阳性质粒模板由上海实验动物研究中心保存。

1.1.2 试剂:质粒抽提试剂盒购自天根生化科技

(北京)有限公司,Taq DNA 聚合酶,PCR buffer, Mg²⁺, dNTP, 100 bp DNA ladder marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司,琼脂糖购自西班牙 Bio West 公司,GoldViewTM 核酸染料购自上海赛百盛(SBS)基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成:根据 GenBank 中已发表的肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌 16S rRNA 序列,参照文献分别设计合成三对特异性引物^[10,11]。

1.2.2 普通 PCR:使用质粒抽提试剂盒对本室保存的阳性重组质粒进行 DNA 提取,作为单重 PCR 的模板进行扩增。反应体系为 20 μ L,其中包括 PCR buffer、dNTP 200 μ mol/L、Taq E 0.15 U、引物各 0.5 μ mol/L、模板 3 ng,去离子水补足至 20 μ L。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。并将 PCR 产物回收后纯化后测序,与比对。

单重 PCR 的敏感度测定方法如下:分别测定肝、胆汁、啮齿类三种质粒模板浓度,将浓度调整至 1 ng/ μ L,再以此为基础,进行 10 倍梯度稀释,终浓度为 1 ng、10⁻¹ ng、10⁻² ng、10⁻³ ng、10⁻⁴ ng、10⁻⁵ ng、10⁻⁶ ng、10⁻⁷ ng、10⁻⁸ ng,各取 1 μ L 作为模板,分别进行 PCR 扩增,从而测定单重 PCR 的敏感度。

1.2.3 多重 PCR 条件优化:根据单重 PCR 的反应体系,将三对引物等比混合加入到同一个反应体系中进行扩增,根据扩增结果对反应条件和体系进行优化,包括退火温度, Mg²⁺ 浓度, dNTP 浓度, 引物浓度等。

1.2.4 多重 PCR 条件电泳检测:取 10 μ L PCR 产物,在浓度为 2% 的琼脂糖凝胶中 100 V 电压电泳时间 90 min,以确保不同大小的扩增产物可以区分开。目的条带在凝胶成像系统中分析。

1.2.5 多重 PCR 特异性检测:为检测引物的特异性,相互之间是否会产生交叉反应,本试验设计了如下引物和模板组合,对多重 PCR 的特异性进行检测,具体组合情况见表 2。

表 1 螺杆菌属 16SrRNA 基因 PCR 扩增引物

Tab. 1 The sequences of primers used to amplify 16SrRNA gene of helicobacters

目的基因 Target genes	引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing temperature	目的片段 Target band
肝 <i>H. hepaticus</i>	B38-F GCATTGAAACTGTTACTCTG	50℃	417 bp
	B39-R CTGTTTTCAAGCTCCCC		
胆汁 <i>H. bilis</i>	P7-F CTATGACGGGTATCCGGC	53℃	374 bp
	Pb-R TCTCCATACTCTAGAAAAGT		
啮齿类 <i>H. rodentium</i>	Hr1-F TTGCGAGGCTTGTCTCTG	50℃	324 bp
	Hr2-R TTAGAGTGCTCTACCGAATA		

表 2 多重 PCR 特异性检测方法
Tab.2 specific multiplex PCR detection method

组合 Combination	1	2	3	4	5	6	7
引物 Primers	肝 H. h.	胆汁 H. b.	啮齿类 H. r.	肝 胆汁 H. h., H. b.	肝 啮齿类 H. h., H. r.	胆汁 啮齿类 H. b., H. r.	肝 胆汁 啮齿类 H. h., H. b., H. r.
模板 Templates	肝 胆汁 啮齿类 H. h., H. b., H. r.						

注: H. h. : *H. hepaticus*; H. b. : *H. bilis*; H. r. : *H. rodentium*
Note: H. h. : *H. hepaticus*; H. b. : *H. bilis*; H. r. : *H. rodentium*

1.2.6 多重 PCR 敏感度测定: 取梯度稀释好的三种质粒模板各 1 μL 加入到已优化好的 PCR 体系中, 进行 PCR 扩增。根据电泳结果对多重 PCR 体系进行敏感度的测定。

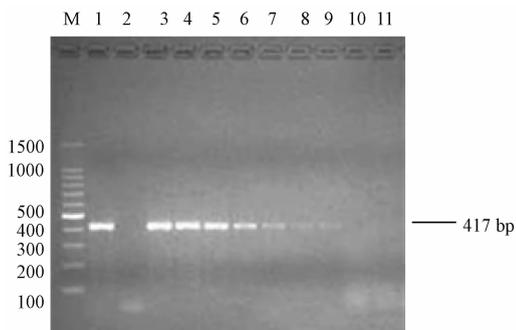
2 结果

2.1 普通 PCR

2.1.1 测序: 将测序结果与 GenBank 所发表的肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌序列进行对比, 同源性达 99% 以上。
2.1.2 敏感度检测: 电泳结果展示, 在单重 PCR 中肝螺杆菌的敏感度达到 10⁻⁶ ng, 胆汁螺杆菌和啮齿类螺杆菌的敏感度均达到 10⁻⁵ ng (图 1-3)。

2.2 多重 PCR 反应体系和条件的优化

根据上述试验设计, 我们主要对退火温度, Mg²⁺ 浓度, dNTP 浓度, 引物浓度等进行了调整。通过优化以上条件, 最终确定最佳退火温度为 52°C



M. 100 bp DNALadder Marker, 1: 阳性对照; 2: 空白对照; 3: 1 ng; 4: 10¹ ng; 5: 10⁻² ng; 6: 10⁻³ ng; 7: 10⁻⁴ ng; 8: 10⁻⁵ ng; 9: 10⁻⁴ ng; 10: 10⁻⁷ ng; 11: 10⁻⁸ ng

图 1 普通 PCR 肝螺杆菌敏感度

M. 100 bp DNALadder Marker, 1: Positive control; 2: Negative control; 3: 1 ng; 4: 10¹ ng; 5: 10⁻² ng; 6: 10⁻³ ng; 7: 10⁻⁴ ng; 8: 10⁻⁵ ng; 9: 10⁻⁴ ng; 10: 10⁻⁷ ng; 11: 10⁻⁸ ng

Fig. 1 Sensitivity test of the PCR for detection *H. hepaticus*.

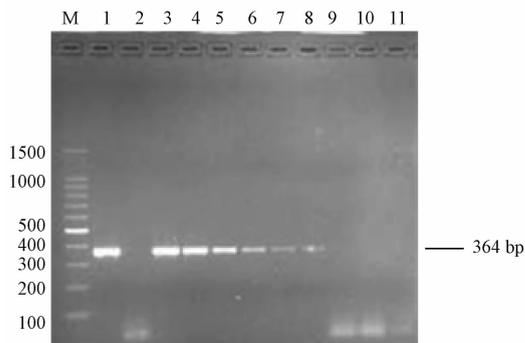
(见图 4), Mg²⁺ 浓度为 2.0 mmol/L (图 5), dNTP 浓度为 200 μmol/L (图 6), 引物浓度为 0.625 μmol/L (图 7)。

2.3 多重 PCR 特异性试验

用优化好的多重 PCR 反应条件, 对不同的引物和模板组合进行扩增, 每个反应都能扩增出预期的目的条带。加入单一模板时均只有一个目的条带, 加入双模板时均为两个目的条带, 加入三种模板时, 所有三个目的条带均能有效扩增出。表明本文建立的多重 PCR 方法对三种螺杆菌能进行有效的扩增, 具有较好的特异性 (图 8)。

2.4 多重 PCR 敏感性试验

对优化好的多重 PCR 方法进行敏感性试验, 从图 9 可以看出肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌敏感度均可达到 10⁻⁵ ng, 即 10 fg。和单重 PCR 相比, 胆汁螺杆菌和啮齿类螺杆菌的敏感性相当, 而肝螺杆菌的

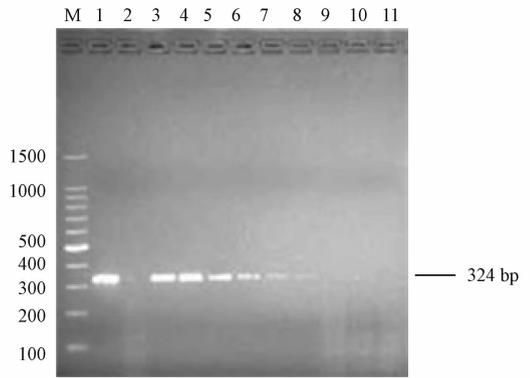


M. 100 bp DNA ladder marker, 1: 阳性对照; 2: 空白对照; 3: 1 ng; 4: 10¹ ng; 5: 10⁻² ng; 6: 10⁻³ ng; 7: 10⁻⁴ ng; 8: 10⁻⁵ ng; 9: 10⁻⁴ ng; 10: 10⁻⁷ ng; 11: 10⁻⁸ ng

图 2 普通 PCR 胆汁螺杆菌敏感度

M. 100 bp DNA ladder marker, 1: Positive control; 2: Negative control; 3: 1 ng; 4: 10¹ ng; 5: 10⁻² ng; 6: 10⁻³ ng; 7: 10⁻⁴ ng; 8: 10⁻⁵ ng; 9: 10⁻⁴ ng; 10: 10⁻⁷ ng; 11: 10⁻⁸ ng

Fig. 2 Sensitivity test of the PCR for detection *H. bilis*.



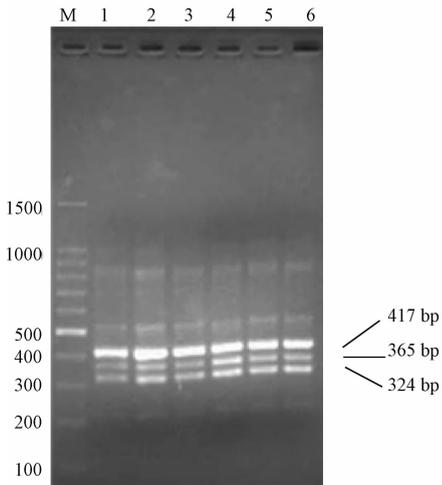
M. 100 bp DNA ladder marker, 1: 阳性对照; 2: 空白对照; 3: 1 ng; 4: 10¹ ng; 5: 10⁻² ng; 6: 10⁻³ ng; 7: 10⁻⁴ ng; 8: 10⁻⁵ ng; 9: 10⁻⁴ ng; 10: 10⁻⁷ ng; 11: 10⁻⁸ ng

图 3 普通 PCR 啮齿类螺杆菌敏感度

M. 100 bp DNA ladder marker, 1: Positive control; 2: Negative control; 3: 1 ng; 4: 10¹ ng; 5: 10⁻² ng; 6: 10⁻³ ng; 7: 10⁻⁴ ng; 8: 10⁻⁵ ng; 9: 10⁻⁴ ng; 10: 10⁻⁷ ng; 11: 10⁻⁸ ng

Fig. 3 Sensitivity test of the PCR for detection *H. rodentium*.

敏感性稍低, 大约降低了一个数量级。(图 9)



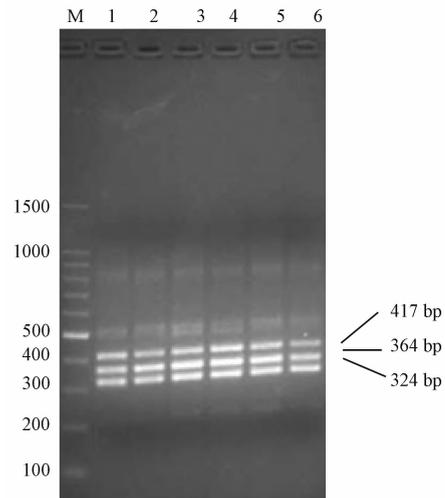
M: 100 bp DNA Ladder Marker
1 ~ 6: 49℃, 50℃, 51℃, 52℃, 53℃, 54℃.

图 4 不同退火温度对多重 PCR 的影响

Fig. 4 The influence of different Annealing temperature for the multiplex PCR.

3 讨论

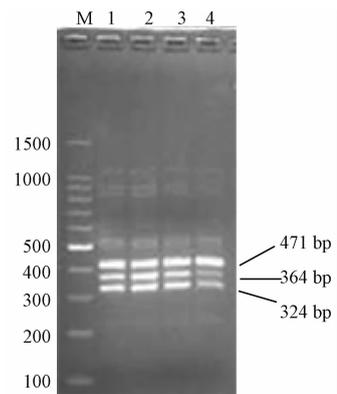
文献显示^[1,2,7,16], 目前我国的大小鼠已存在不同程度的螺杆菌感染, 尤其是肝螺杆菌和胆汁螺杆菌的感染已广泛存在于实验室以及一些大小鼠养殖基地。而且已有报道这类细菌不仅在人或动物的胃炎、消化性溃疡、胃恶性肿瘤的发生发展中起



M: 100 bp DNA Ladder Marker
1 ~ 6: 1.25 mM, 1.5 mM, 1.75 mM, 2 mM, 2.25 mM, 2.5 mM

图 5 不同 Mg²⁺ 浓度对多重 PCR 的影响

Fig. 5 The influence of different Mg²⁺ concentration for the multiplex PCR.



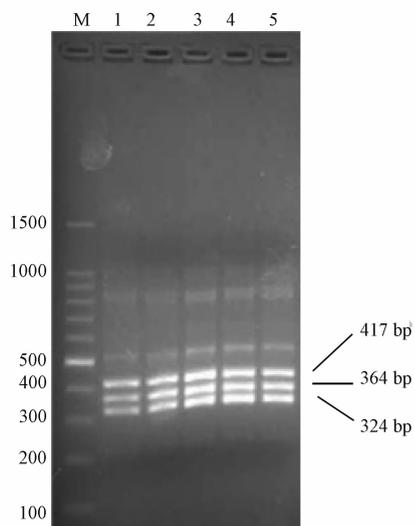
M: 100 bp DNA Ladder Marker
1 ~ 4: 150 μM, 200 μM, 250 μM, 300 μM

图 6 不同 dNTP 浓度对多重 PCR 的影响

Fig. 6 The influence of different dNTP concentration for the multiplex PCR.

到致病作用, 也可能与肠道、胆道、肝脏的炎症性疾病和一些肿瘤的发生相关^[17]。但啮齿动物螺杆菌感染的动物大多数以慢性、潜伏性感染为主^[7], 无明显症状, 故对啮齿动物是否携带菌种的观察及检测造成了一定难度。因此, 建立一种快速、敏感、特异的诊断方法显得尤为重要。

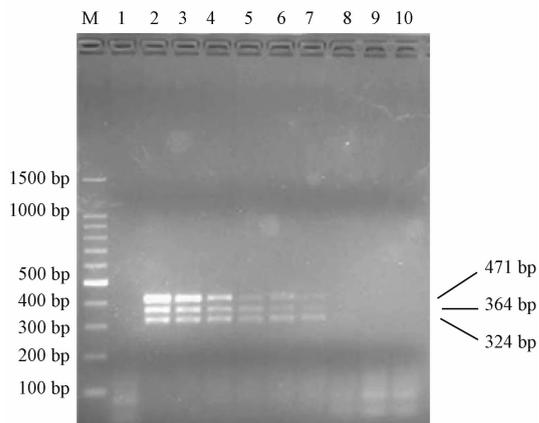
多重 PCR 作为一种快速省时, 特异性强, 灵敏度高而且较为可靠的病原检测方法, 近年来在很多领域都有着较为广泛的应用, 尤其体现在对各种病原微生物的检测。高正琴、张强^[18]等建立的肝螺杆菌多种毒力基因的多重 PCR 检测方法, 不仅解决了



M: 100 bp DNA ladder marker
1 ~ 5: 0.25 μ M, 0.5 μ M, 0.625 μ M, 0.75 μ M, 1.0 μ M

图 7 不同引物浓度对多重 PCR 的影响

Fig. 7 The influence of different primer concentrations the multiplex PCR.

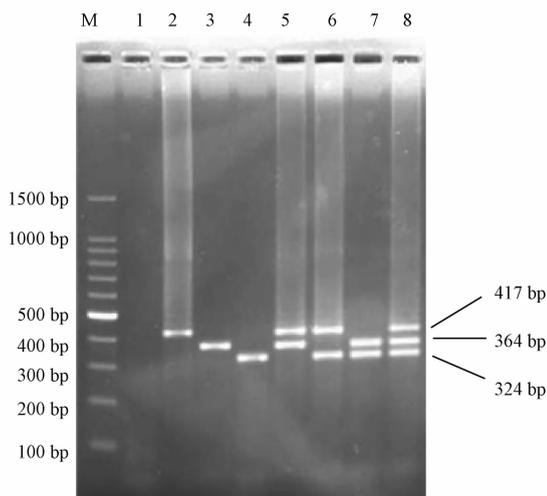


M: 100 bp DNA ladder marker
1: 空白对照; 2: 1ng; 3: 10^{-1} ng; 4: 10^{-2} ng; 5: 10^{-3} ng; 6: 10^{-4} ng; 7: 10^{-5} ng; 8: 10^{-6} ng; 9: 10^{-7} ng; 10: 10^{-8} ng;

图 9 多重 PCR 灵敏度分析

M: 100 bp DNA ladder marker
1: Negative control; 2: *H. hepaticus*; 3: *H. bilis*; 4: *H. rodentitum*; 5: *H. hepaticus* & *H. bilis*; 6: *H. hepaticus* & *H. rodentitum*; 7: *H. bilis* & *H. rodentium*; 8: *H. hepaticus* & *H. rodentium*

Fig. 9 Sensitivity test of the multiplex PCR for detection *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. rodentium*.



M: 100 bp DNA ladder marker
1: 空白对照; 2: 肝; 3: 胆汁; 4: 啮齿类; 5: 肝、胆汁; 6: 肝、啮齿类; 7: 胆汁、啮齿类; 8: 肝、胆汁、啮齿类

图 8 多重 PCR 特异性

M: 100 bp DNA ladder marker
1: Negative control; 2: *H. hepaticus*; 3: *H. bilis*; 4: *H. rodentitum*; 5: *H. hepaticus* & *H. bilis*; 6: *H. hepaticus* & *H. rodentium*; 7: *H. bilis* & *H. rodentium*; 8: *H. hepaticus* & *H. rodentium*

Fig. 8 Specificity test of the multiplex PCR detection.

肝螺杆菌体外培养的困难,操作也较传统的细菌学分离培养法大幅度简化,为其后续大规模检测应用中节省了大量时间。李晨等^[19]通过对水产病原菌的多重 PCR 检测认为,相比一般的生化检测方法,多重 PCR 明显的优势体现为省时、灵敏,但对比特

异性和灵敏度同样优异的基因芯片技术,多重 PCR 的前期材料准备简单和成本较低在实践应用中更便于广泛推广。另外,细菌学多重 PCR 检测普遍显示^[8-11],针对免疫学交叉反应较为明显的干扰,多重 PCR 的单管操作对特异性结果的显示更为精准。通过大量与形态学、生理学、生物化学、免疫学等方法比较的实验结果明确展示^[16-20],多重 PCR 方法是一种值得推广,具有较好发展前景的病原检测方法。

本实验建立的肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌多重 PCR 检测方法,能够快速而准确地检测啮齿动物回盲内容物中是否存在上述三种螺杆菌,该方法不仅具备了普通 PCR 准确、敏感的优势,而且大大提高了检测效率,节省了试剂,为大范围的流行病学调查提供了技术支持。

多重 PCR 方法建立很重要的一步在于 PCR 反应条件的优化,据文献查阅以及预实验,确定对多重 PCR 影响较大的条件主要包括退火温度, Mg^{2+} 浓度, dNTP 浓度, 引物浓度, 其中退火温度的优化又更为重要,退火温度的测定,直接决定了 PCR 反应的结果^[12-15]。退火温度过高或过低,都会导致后续条件优化的困难以及菌种检测。本实验通过对以上几种条件分别进行单一变量优化,最终获得了最佳扩增效果。

在 PCR 方法建立过程中,特异性的验证也是必不可少的一环,本实验通过不同的引物和模板组合进行交叉检验,结果证明了本文构建的多重 PCR 方法特异性完全符合要求。

另外,在对多重 PCR 敏感度的检测中发现,建立的该多重 PCR 体系对肝、胆汁、啮齿类三种螺杆菌的敏感度分别为 10 fg、10 fg、10 fg,而在此前进行的普通 PCR 中三种螺杆菌的敏感度分别为 1fg、10fg、10fg。两组数据对比可发现,构建的多重 PCR 中各对引物扩增时的互相竞争并不明显,故采用多重 PCR 也可得到较为良好的效果。由此可见,该多重 PCR 方法具有可行性。

通过多种比较,可表明,本文建立的螺杆菌多重 PCR 检测方法具有高效、敏感、特异的优点,可以应用在啮齿动物螺杆菌检测中。

参考文献:

- [1] 陈锡福,李红. 啮齿动物螺杆菌研究现状 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(6):238-242.
- [2] 张丽芳,刘星,李红. 啮齿类螺杆菌的分离鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(3):215-219.
- [3] Ward JM, Fox JG, Anver MR, et al. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species [J]. Natl Cancer Inst, 1994, 86(16):1222-1227.
- [4] Fox JG, Rogers AB, Whary MT, et al. *Helicobacter bilis* associated hepatitis in outbred mice [J]. Comp Med, 2004, 54(5):571-577.
- [5] Whary MT, Fox JG. Detection, eradication, and research implications of *Helicobacter* infections in laboratory rodents [J]. Lab Animal, 2006, 35(7):25-36.
- [6] 张丽芳,刘星,李红. 啮齿类螺杆菌不同检测方法的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(5):62-65.
- [7] 王建飞. 啮齿动物的一种新病原体—螺杆菌 (*Helicobacter*) 研究概况 [J]. 上海实验动物科学, 1996, 16(2):108-110.
- [8] Poynter S, Phipps JD, Poynter S, Naranjo-Pino A, et al. Difficulties in the molecular diagnosis of *Helicobacter rodent* infections [A]. Vet Microbiol. 2006, 134:272-278.
- [9] 许一平,成炜,邵彦春,等. 沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的多重 PCR 检测 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(6):89-94.
- [10] Goto K, Ohashi H, Takakura A. Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rat, gerbils, and house musk shrews in Japan [J]. Cur Microbiol, 2000, 41(6):161-166.
- [11] Lela KR, Craig LF, Reuel RH. Identification of murine *Helicobacter* by PCR and restriction enzyme analyses [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34:942-946.
- [12] 黄银花,胡晓湘,徐慰焯,等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素 [J]. 遗传, 2003, 25(1):65-68.
- [13] Chambercian JS, Jibbs RA, Ranier JE, et al. Detection screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. Nucl Acids Res. 1998 (16):1141-1156.
- [14] Herbergs JM, Siwek APMA, Crooijmans J, et al. Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP makes in chicken [J]. Animals Genetics. 1999, 30:274-285.
- [15] 郑景生,吕蓓. PCR 技术及实用方法 [J]. 分子植物育种. 2003, 3(1):381-394.
- [16] 丁聪,冯洁,谢建云,等. 两种方法对上海及周边地区饰演大小鼠螺杆菌携带情况的调查 [J]. 中国比较医学杂志. 2011, 21(12):66-69.
- [17] Zenner L. Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1999, 22(1):41-61.
- [18] 高正琴,张强,贺争鸣,等. 肝螺杆菌多重 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 人兽共患病学报, 2008, 24(10):891-895.
- [19] 李晨,王秀华,黄捷. 三种主要水产病原菌多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 渔业科学进展, 2010, 31(6):100-106.
- [20] 马保臣,秦卓明,蔡玉梅,等. 多重 PCR 检测奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停链球菌和酵母菌方法的建立与应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11):1202-1208.

[修回日期]2012-11-05