

念珠状链杆菌 Taqman MGB 荧光定量 PCR 检测方法的建立与初步应用

邢 进¹, 冯育芳¹, 岳秉飞¹, 贺争鸣¹, 戴方伟², 萨晓婴², 代解杰³

(1. 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050;
2. 浙江省医学科学院实验动物中心, 杭州 310013; 3. 中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

【摘要】 目的 建立念珠状链杆菌的实时荧光定量 PCR 检测方法, 实现该菌在多种实验动物中的快速检测。
方法 根据 NCBI 公布的念珠状链杆菌序列, 设计特异性引物和探针, 通过对 24 株标准参考菌株的扩增, 验证其特异性、敏感性和重复性。运用所建立的方法对小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、兔、长爪沙鼠和树鼩的共 823 份呼吸道样本进行检测。**结果** 用所建 Taqman MGB 荧光定量 PCR 方法在小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠和兔中未检出念珠状链杆菌; 检出普通级长爪沙鼠和树鼩中念珠状链杆菌的阳性率分别为 1.5% (1/65) 和 61.7% (37/60)。**结论** 本研究建立的念珠状链杆菌 Taqman MGB 荧光定量 PCR 检测方法, 能够对实验动物中念珠状链杆菌进行快速准确的检测, 敏感性优于国标方法, 为实验动物质量检测体系的完善奠定了基础。

【关键词】 念珠状链杆菌; 荧光定量 PCR; 检测方法; 实验动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 08-0062-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.008.013

Establishment and application of a Taqman MGB real-time PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*

XING Jin¹, FENG Yu-fang¹, YUE Bing-fei¹, HE Zheng-ming¹, DAI Fang-wei², SA Xiao-ying², DAI Jie-jie³

(1. National Institute of Food and Drug Control, Institute of Laboratory Animal Resources, Beijing 100050, China;

2. Center of Laboratory Animals, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013;

3. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medicine Sciences, Kunming 650118)

【Abstract】 Objective To establish a real-time quantitative PCR (qPCR) method for detection of *Streptobacillus moniliformis*, which can be used to rapidly detect this pathogen in laboratory animals. **Method** According to the *S. moniliformis* sequences published in NCBI, we designed specific primers and MGB probe. The specificity, sensitivity and stability of this method were evaluated using 24 standard reference strains. Total of 823 respiratory specimens of animals including mice, rats, guinea pigs, hamsters, rabbits, Mongolian gerbils and tree shrews, were detected by this established Taqman MGB qPCR method. **Results** We had successfully established the *S. moniliformis* Taqman MGB qPCR method. *S. moniliformis* was not detected in the samples of mice, rats, guinea pigs, hamsters and rabbits. The positive rate of *S. moniliformis* was 1.5% (1/65) and 61.7% (37/60) in conventional Mongolian Gerbils and tree shrews, respectively. **Conclusions** Our developed qPCR method can be used to effectively detect *S. moniliformis* in laboratory animals.

【基金项目】 国家科技支撑计划: 实验动物质量检测体系的完善与检测关键技术研究 (2013BAK11B00), 实验动物质量检测关键技术研究 (2013BAK11B01)。

【作者简介】 邢进 (1979 -), 副研究员。研究方向: 实验动物微生物学。E-mail: xjvet@nifdc.org.cn。

【通讯作者】 贺争鸣 (1957 -), 博士, 研究员。研究方向: 实验动物微生物学。E-mail: zhengminghe57@163.com。

Moreover, its accuracy and sensitivity are better than the national standard method. This study laid the foundations for optimizing the quality inspection system of laboratory animals.

【Key words】 *Streptobacillus moniliformis*; Real-time PCR; Detection method; Laboratory animals

念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)是一种革兰氏阴性杆菌,作为重要的人兽共患病原^[1],可存在于各种正常鼠类或病鼠的口咽部、中耳及上呼吸道,具有高度多形性,在多种实验动物中都有发现,是人类鼠咬热(rat-bite fever)和哈佛山热(Haverhill fever)的病原^[2,3]。该菌在国内 C57BL/6J 和 KM 小鼠中曾爆发自然感染^[4,5],被列为实验动物清洁级动物必要时检测的项目^[6]。分离培养是该菌最常规和经典的检测方法,而因其对营养和气体条件要求较高,培养相对困难^[1],很容易造成漏检。鉴于其危害程度,已有很多念珠状链杆菌检测方法的研究,如间接酶联免疫吸附试验(ELISA)^[7]、普通 PCR 方法^[8,9]、免疫印迹(EB)^[10]、质谱分析法(ESI-MS)^[11]和蛋白芯片法^[12]等。这些方法多存在特异性、敏感性和操作复杂等问题。近年来已经广泛应用在病原检测的 Taqman MGB 荧光定量 PCR 方法^[13]以其极高的特异性、灵敏度和检测效率,已经成为临床上的重要检测手段。目前在国内外还未见有应用荧光定量 PCR 方法检测念珠状链杆菌的报道。本研究应用该技术,建立了一种对念珠状链杆菌的实时荧光定量 PCR 检测方法,并成功的在动物样本中进行了初步应用。

1 材料

1.1 标准菌株和质粒

1.1.1 标准菌株:念珠状链杆菌(ATCC14647)阳性菌株和 23 株对照参考菌株:沙门氏菌(CMCC47001)、大肠杆菌(CMCC44711)、肺炎链球菌(CMCC31210、CMCC36001)、粪链球菌(CMCC32219)、支气管鲍特杆菌(CMCC58401)、多杀巴斯德杆菌(ATCC43137)、嗜肺巴斯德杆菌(ATCC12555)、小鼠放线杆菌(ATCC49577)、肺炎支原体(ATCC15531)、肺支原体(ATCC19612)、鼠棒状杆菌(CMCC65013)、假结核也尔森氏菌(CMCC53501)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(CMCC52301)、绿脓杆菌(ATCC27853)、单核细胞增生性李斯特杆菌(CMCC54004)、宋内氏志贺菌(CMCC51082)、金黄色葡萄球菌(CMCC25923)、啮齿类枸橼酸杆菌(ATCC BAA-352)、阴沟肠杆菌(CMCC13047)、乙型溶血性链球菌(CMCC32210)、

白色念珠菌(CMCC10231)、肺炎克雷伯杆菌(CMCC46108)。

1.1.2 标准品质粒:念珠状链杆菌目的片段转化至大肠杆菌感受态细胞 JM109 由宝生物工程(大连)有限公司合成制备,本室保存。

1.2 培养基和试剂

哥伦比亚血琼脂培养基购自美国 Oxoid, Nuclease-Free Water 购自美国 Promega, DNA 提取试剂盒 QIAamp 96 DNA QIAcube Kit 购自德国 Qiagen, Taqman Gene Expression Master Mix 购自美国 ABI。

1.3 动物样本

共 823 份实验动物呼吸道样本,包括 358 份小鼠气管、90 份大鼠气管、110 份豚鼠气管、10 份地鼠气管、130 份兔咽拭子、65 份沙鼠气管收集于北京地区,60 份野生驯化树鼩呼吸道样本由中国医学科学院医学生物学研究所提供。

1.4 仪器设备

德国 Qiagen QIAcube 自动核酸提取仪,美国 Thermo Fisher A2 生物安全柜,美国 ABI 7500Fast 荧光定量 PCR 仪,上海安亭 WGP-600 隔水恒温培养箱。

2 方法

2.1 念珠状链杆菌的培养和 DNA 的提取

将复苏后冻存的菌种接种于哥伦比亚血琼脂平皿,置 37℃ 培养 48 h。菌落使用 Qiagen 基因组 DNA 提取试剂盒提取念珠状链杆菌、其他 23 株参考菌株及动物样品的基因组 DNA,操作根据试剂盒说明进行。

2.2 引物和探针

念珠状链杆菌此前被划分为 *Fusobacteriaceae* 菌科^[14],而经过近两年的最新研究,目前将念珠状链杆菌与另三个属的菌株 *Sebadella*, *Sneathia* 和 *Leptotrichia* 重新组成了 *Leptotrichiaceae* 菌科^[15]。因此将念珠状链杆菌在内的 8 株 *Leptotrichiaceae* 菌科菌株,以及 NCBI Genbank 中已知的 11 株念珠状链杆菌 16S rRNA 应用 Vector NTI advance11 进行同源性分析,应用 Primer Express 3.0 根据 16S V3 可变区序列设计 Taqman MGB 荧光定量 PCR 引物和探针(图 1)。上游引物 SmF 24 bp:5'-TTTTCGGATT

GTAAAGTGCTTTCA-3', 下游引物 SmR 23 bp: 5'-TTTAGCCGTCGCTTCTTCTGTAG-3', Sm-MGB probe 23 bp: FAM 5'-TAGGGAAGAAGAAGATGACGGTA-3' MGBNFQ, 目的片段长度 72 bp。引物和探针由美国 ABI 公司合成制备。

2.3 念珠状链杆菌 Taqman MGB 探针荧光定量 PCR (qPCR) 检测方法的建立

2.3.1 标准曲线的绘制: 将质粒作 10 倍梯度稀释, 浓度为 $1 \times 10^9 \sim 1$ 拷贝/ μL 。通过对标准质粒的扩增, 优化并确定实时 qPCR 的反应体系和最佳反应条件。总反应体系 20 μL , 20 $\times$ 上、下游引物 (各 18 $\mu\text{mol/L}$) 和探针 (5 $\mu\text{mol/L}$) 混合液 0.5 μL , 2 $\times$ TaqMan[®] Gene Expression Master Mix 10 μL , 模板 DNA 1 μL , Nuclease-Free Water 8.5 μL 。扩增条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 各 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 40 个循环。每个稀释度的标准品同时重复进行 3 个反应, 并用无菌水为模板作为阴性对照。取适宜质粒稀释度的扩增结果绘制标准曲线。

2.3.2 特异性验证: 用合成的引物和探针针对 23 株标准菌株进行 qPCR 反应, 观察所建立方法与其他参考菌株有无交叉反应。

2.3.3 敏感性检测: 去标准品质粒进行 10 倍梯度稀释, 以浓度为 1×10^9 拷贝/ μL 、 1×10^8 拷贝/ μL 、

1×10^7 拷贝/ μL 、 1×10^6 拷贝/ μL 、 1×10^5 拷贝/ μL 、 1×10^4 拷贝/ μL 、 1×10^3 拷贝/ μL 、100 拷贝/ μL 、10 拷贝/ μL 和 1 拷贝/ μL 各 1 μL 作为模板, 按上述条件进行 qPCR 扩增。

2.3.4 重复性检测: 以浓度为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^4$ 拷贝/ μL 的质粒标准品作为模板, 重复进行 3 次 qPCR 反应, 3 次反应的 Ct 值结果用作组间比对。将标准曲线绘制时的 3 次重复反应结果用作组内比对。通过计算标准偏差和变异系数分析该方法的重复性。

2.3.5 样品检测: 用所建立的方法对小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、兔、沙鼠和树鼩的呼吸道样本进行检测, 所得结果与经典的分离培养法进行比较。

3 结果

3.1 标准曲线

取适宜质粒稀释度 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^4$ 拷贝/ μL 的扩增结果绘制标准曲线。标准曲线方程为 $Y = -3.34X + 43.018$, 相关系数 $R^2 = 0.999$, 扩增效率为 99.255% (图 2)。

3.2 特异性

该方法对 23 株标准菌株进行 qPCR 反应, 无交叉反应发生 (图 3)。念珠状链杆菌阳性对照的初始浓度与 1×10^7 拷贝/ μL 的浓度相当, 阴性空白对照

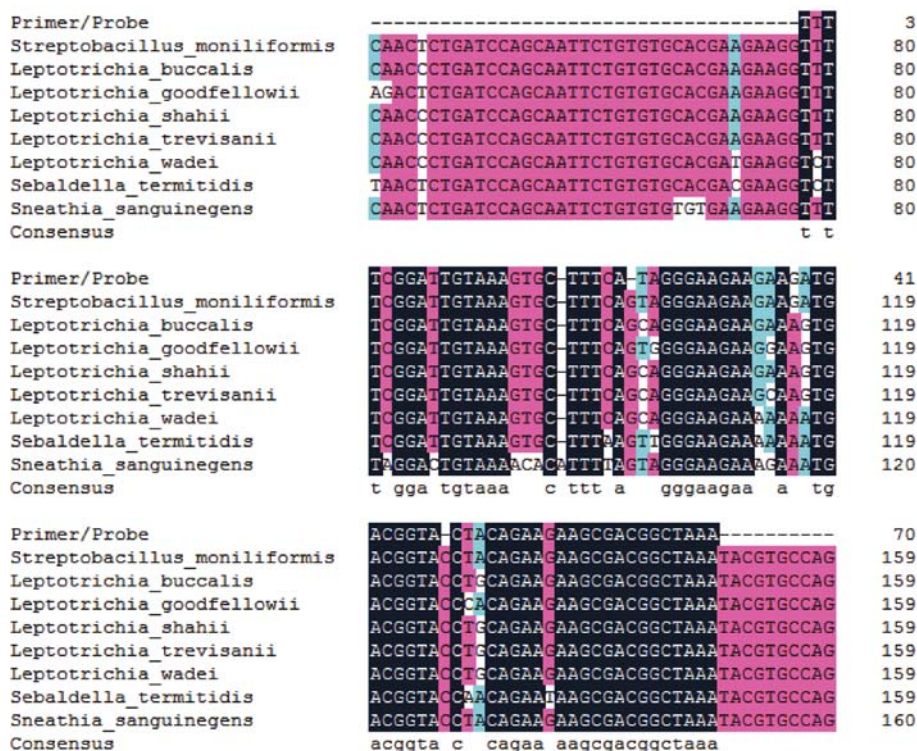


图 1 *Leptotrichiaceae* 菌株 16 S rRNA 序列分析

Fig. 1 Analysis of the 16 S rRNA of *Leptotrichiaceae* strain

无扩增曲线产生。

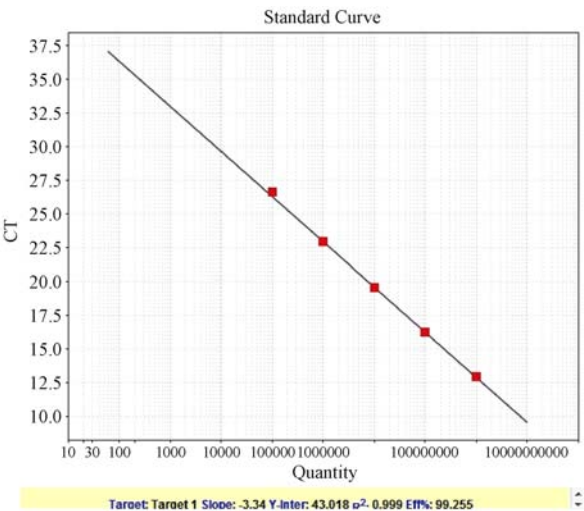


图 2 念珠状链杆菌 Real-time PCR 标准曲线

Fig.2 Standard curve of the TaqMan MGB probe real time quantitative PCR for *S. moniliformis*

3.3 敏感性

用倍比稀释的重组质粒作为标准阳性模板进行 qPCR(图 4)。所建 qPCR 的最低检测限为 10 拷贝/ μ L。

3.4 重复性

对质粒标准品 1×10^9 copies/ μ L ~ 100 copies/

μ L 同时重复 3 次 qPCR,对 1×10^8 copies ~ 1×10^4 copies 分 3 次进行 qPCR 扩增。所得 Ct 值计算变异系数(CV),组内变异系数在 0.10 ~ 2.31%,组间在 0.23 ~ 3.67%,均在 5% 以下,表明重复性良好,具体结果见表 1,表 2。

3.5 动物中念珠状链杆菌的检测结果

用所建立的念珠状链杆菌 Taqman MGB qPCR 检测方法检测小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、兔、长爪沙鼠和野生树鼩共 823 份动物呼吸道样本进行检测,结果小鼠、大鼠、豚鼠和兔的结果全部为阴性,长爪沙鼠阳性率为 1.5% (1/65),树鼩阳性率为 61.7% (37/60)。

4 讨论

16 S rRNA V3 高可变区是引物探针设计的理想区域^[16]。本研究根据此区域所设计的 Taqman 引物和 MGB 探针,能够非常有效的区别包括念珠状链杆菌在内的众多属种的菌株,同时与 *Fusobacteriaceae* 菌科其他菌属菌株的比对,保证了所建方法良好的特异性和敏感性。此前荷兰学者 Boot 所建立的念珠状链杆菌 16 S rRNA 普通 PCR 检测方法敏感性可达 2 ~ 6 copis/ μ L,但是对 *Fusobacterium necrogenes* 和 *Sebaldella termitidis* 也会出现非特异的阳性条带,须利用限制性内切酶 BfaI

表 1 念珠状链杆菌 qPCR 组内重复性检测

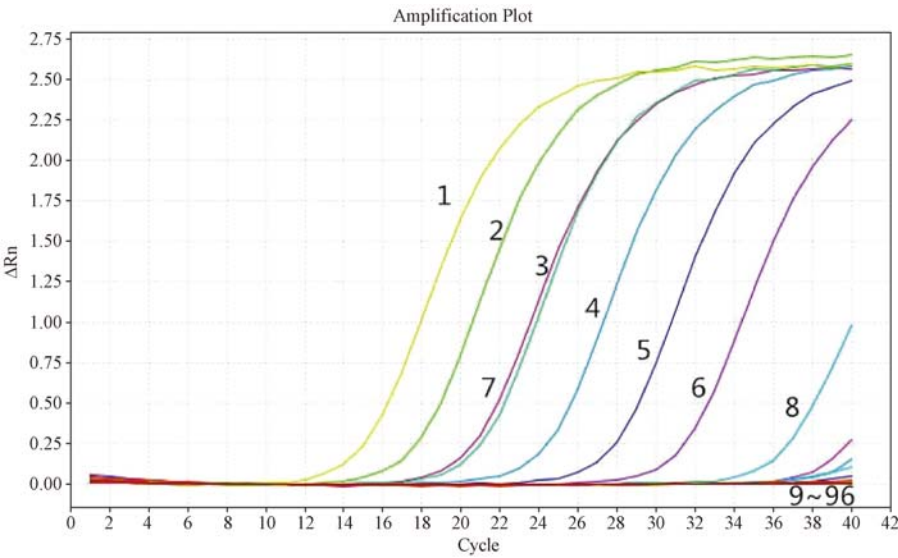
Tab.1 Repeatability verification of *S. moniliformis* real-time quantitative PCR intra-assay in the same sample in different concentrations

重复性 Repeatability	质粒拷贝数 Copies		CT 值 CT value		Mean	SD	CV%
组内 Different concentration of the same sample	10 ⁹	12. 574	12. 950	12. 981	12. 835	0. 227	1. 77
	10 ⁸	15. 729	15. 948	15. 797	15. 825	0. 112	0. 71
	10 ⁷	19. 799	19. 609	19. 337	19. 582	0. 232	1. 19
	10 ⁶	22. 943	22. 894	22. 839	22. 892	0. 052	0. 23
	10 ⁵	26. 770	26. 845	26. 661	26. 759	0. 093	0. 35
	10 ⁴	29. 281	29. 334	29. 288	29. 301	0. 029	0. 10
	10 ³	33. 359	33. 314	33. 130	33. 268	0. 121	0. 36
	10 ²	36. 525	35. 837	34. 883	35. 748	0. 825	2. 31

表 2 念珠装链杆菌 qPCR 组间重复性检测

Tab.2 Repeatability verification of *S. moniliformis* real-time quantitative PCR inter-assay in different samples in different concentrations

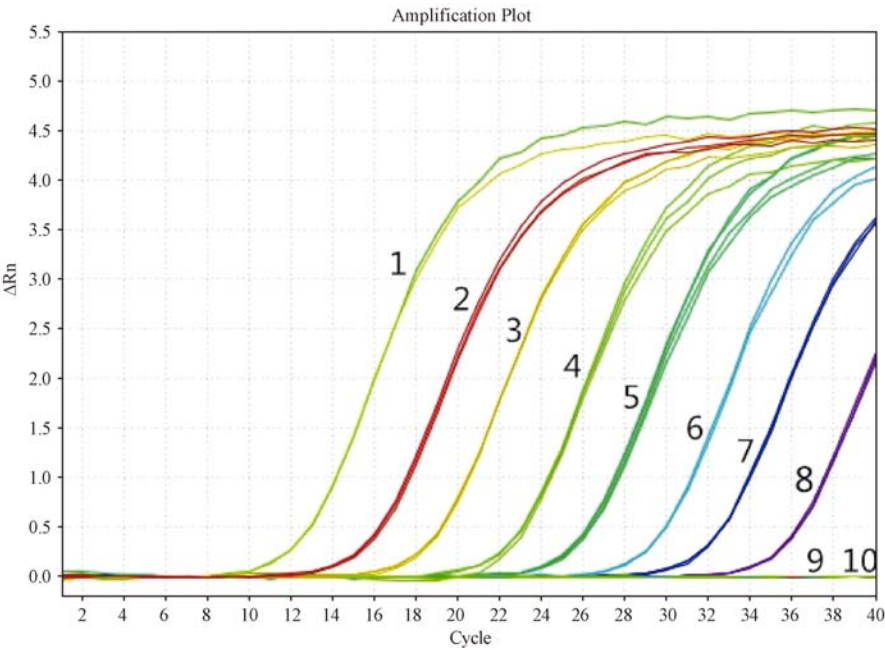
重复性 Repeatability	质粒拷贝数 Copies	CT 值 CT value			Mean	SD	CV%
组间 Different samples of the same concentration	10 ⁸	14. 639	14. 700	14. 694	14. 678	0. 034	0. 23
	10 ⁷	18. 292	18. 390	18. 049	18. 244	0. 176	0. 96
	10 ⁶	21. 549	20. 930	21. 320	21. 266	0. 313	1. 47
	10 ⁵	24. 902	23. 270	24. 709	24. 294	0. 892	3. 67
	10 ⁴	27. 964	27. 985	28. 468	28. 139	0. 285	1. 01



1~6. 模板质粒标准品浓度分别为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^4$ 拷贝/ μ L;7. 念珠状链杆菌 DNA 阳性对照;8. 沙鼠样本 48 号阳性结果;9. 水为模板空白对照;10~63. 其它 64 份沙鼠样本阴性检测结果;64~96. 23 株参考菌株扩增结果。

图 3 qPCR 检测念珠状链杆菌特异性和沙鼠样品检测结果

Fig.3 Specificity of the Mongolian gerbil samples and the results of TaqMan MGB probe real time quantitative PCR for *S. moniliformis*.



1~9. 模板质粒标准品浓度分别为 $1 \times 10^9 \sim 1$ 拷贝/ μ L;10. 水为模板空白对照。

图 4 qPCR 检测念珠状链杆菌敏感性结果

Fig.4 Sensitivity results of TaqMan MGB probe real time quantitative PCR for *S. moniliformis*.

对产物进行酶切才能够区分^[8]。

用本研究所建立的 Taqman MGB qPCR 方法对北京地区绝大部分实验动物中未检出念珠状链杆菌的存在,与培养法的检测结果相符。而在普通级长爪沙鼠和野生树鼯中检测出阳性,与此前的研究结果不同,分离培养法未分离得到念珠状链杆菌^[17]。这与 R. Boot 的研究结果相符,用 PCR 和 ELISA 方法能够检测出阳性的人工感染大鼠,用培养法则不能检出^[8]。念珠状链杆菌对培养条件要求相对较高,通过血琼脂平皿培养时,(48~72)h 仅

形成(0.5~1) mm 的不溶血小菌落,临床样本中又存在大量多种微生物,使分离培养非常困难。长爪沙鼠和树鼩还属于新型实验动物,长爪沙鼠虽已经经过了一定程度的净化,但本研究中所用沙鼠为普通级别,所含微生物种类依然很丰富。树鼩样品为野生驯化种群,其较高的感染率应为其野生状态的直接体现。日本学者 Kimura 同样根据 16 S rRNA 建立了普通 PCR 方法,在褐家鼠(*R. norvegicus*)和黑鼠(*R. rattus*)中检出念珠状链杆菌的阳性率分别为 92% (61/66) 和 58% (30/52),而在 SPF 及大鼠(Wistar,SD)中则未检测出该菌污染^[18]。

念珠状链杆菌作为实验动物微生物质量检测中必要时检测的病原菌,在日常检测中往往会被忽视。本研究发现该菌作为一种重要的人兽共患病原,在实验动物中感染的风险依然较高。经过对标准菌株和 823 份动物呼吸道样本的验证和检测,所建立的荧光定量 PCR 方法具有良好的特异性、敏感性和稳定性,能够满足快速检测念珠状链杆菌的要求。

参考文献:

- [1] Wullenweber M. *Streptobacillus moniliformis* — a zoonotic pathogen. Taxonomic considerations, host species, diagnosis, therapy, geographical distribution [J]. *Lab Anim*, 1995. 29 (1): 1–15.
- [2] Elliott SP. Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis* [J]. *Clin Microbiol Rev*. 2007, 20(1): 13–22.
- [3] 刘星,李红. 念珠状链杆菌的研究现状[J]. *中国实验动物学报*, 2007(06): 474–476.
- [4] 李红,陈卫兰,蒋观成,等. 念珠状链杆菌在小鼠群中的自然感染和发病特征的观察[J]. *中国实验动物学报*, 1995, 3 (02): 80–86.
- [5] 王春玲,关伟红,蔡锦霞,等. 实验小鼠念珠状链杆菌和鼠痘病毒混合感染的诊断[J]. *实验动物科学与管理*, 1999, 16 (1): 3–5.
- [6] GB/T 14922.2–2010, 实验动物 微生物学等级及监测[S], 中华人民共和国国家标准, 2010.
- [7] Boot R, Bakker RH, Thuis H, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring rodent colonies for *Streptobacillus moniliformis* antibodies[J]. *Lab Anim*, 1993. 27 (4): 350–357.
- [8] Boot R, Oosterhuis A, Thuis HC, et al. PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis* [J]. *Lab Anim*, 2002. 36(2): 200–208.
- [9] Boot R, Van de Berg L, Reubsaet FA, et al. Positive *Streptobacillus moniliformis* PCR in guinea pigs likely due to *Leptotrichia spp* [J]. *Vet Microbiol*. 2008, 128(3–4): 395–399.
- [10] Boot R, Van de Berg L, Vlemminx MJ, et al. Detection of antibodies to *Streptobacillus moniliformis* in rats by an immunoblot procedure[J]. *Lab Anim*, 2006. 40(4): 447–455.
- [11] Mackey JR, Melendez EL, Farrell JJ, et al. Direct detection of indirect transmission of *Streptobacillus moniliformis* rat bite fever infection[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(6): 2259–2261.
- [12] 林树柱,张丽芳,刘星,等. 实验动物病原菌的一体化蛋白芯片检测方法[D], 实验动物与药理学、毒理学研究学术交流会议论文集, 2009, 253–257.
- [13] Afonina IA, Reed MW, Lusby E, et al. Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence [J]. *Biotechniques*. 2002, 32(4): 940–4, 946–9.
- [14] Gastra W, Boot R, Ho HT, et al. Rat bite fever[J]. *Vet Microbiol*, 2009. 133(3): 211–228.
- [15] Staley JT, Whitman WB, Krieg NR, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4 (2nd ed.) [M]. New York, Springer. 2011, 789.
- [16] Chakravorty S, Helb D, Burday M, et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria[J]. *J Microbiol Methods*, 2007. 69(2): 330–339.
- [17] 邢进,冯育芳,付瑞,等. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查[J]. *实验动物科学*, 2012, 29(03): 34–38.
- [18] Kimura M, Tanikawa T, Suzuki M, et al. Detection of *Streptobacillus spp.* in feral rats by specific polymerase chain reaction[J]. *Microbiol Immunol*. 2008, 52(1): 9–15.

[修回日期] 2015-06-08