

胆汁螺杆菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

伍妙梨, 袁文, 饶丹, 王静, 朱余军, 尹雪琴, 黄韧, 郭鹏举

(广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663)

【摘要】 目的 建立快速、敏感、特异的胆汁螺杆菌(*Helicobacter bilis*, *H. bilis*) TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法, 对胆汁螺杆菌进行定量检测。**方法** PCR 扩增 *H. bilis* 保守基因 P17 序列全长 ORF435 bp, 进行 TA 克隆, 构建质粒标准品 pMD-HBP17。通过对 pMD-HBP17 标准品的定量分析, 优化反应体系, 检测 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度、特异性及重复性; 用所建立的 qPCR 方法检测 77 份临床样品, 并与普通 PCR 的检测结果作比对。**结果** 所建立的 qPCR 检测方法, 质粒 DNA 浓度在 $10^8 \sim 10^1$ 拷贝之间表现出较好的线性和相关性, 所得标准曲线的斜率为 -3.46 , 相关系数为 0.999 , 检测灵敏度达到 20 个拷贝, 对 77 份临床样品的检出率为 14.3% , 较普通 PCR (7.8%) 的检出率高。**结论** 建立的 *H. bilis* qPCR 检测方法特异性好、敏感性高、稳定性强, 可用于胆汁螺杆菌的定量及定性检测。

【关键词】 胆汁螺杆菌(*H. bilis*); 荧光定量 PCR(qPCR); TaqMan 探针

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0059-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.014

Detection of *Helicobacter bilis* using quantitative real-time PCR with TaqMan probe

WU Miao-li, YUAN Wen, RAO Dan, ZHU Yu-jun, WANG Jing, YIN Xue-qin, GUO Peng-ju
(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals,
Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 Objective To develop a rapid, sensitive and specific assay based on TaqMan probe real-time PCR to quantitate *Helicobacter bilis* (*H. bilis*). **Method** A 435 bp specific fragment of *H. bilis* P17 gene was amplified by PCR, then cloned into pMD19-T vector to construct a recombinant plasmid pMD-HBP17, which was used as standard DNA of this qPCR method. The qPCR system was optimized by using serial dilution of standard plasmid. The sensitivity, specificity, repeatability and quantitation range of this method were evaluated. The established method was used to detect 77 clinical samples. **Result** The quantitative standard curve from 10^8 copies/well to 10^1 copies/well of serial diluted plasmid DNAs showed that they had good linear correlation, the slope of the standard curve was -3.46 , $R^2 > 0.999$, and the lowest limit reached 2×10^1 copies/well. The positive rate of *H. bilis* detected by qPCR was 14.3% which is higher than detected by PCR (7.8%). **Conclusion** This qPCR method showed high sensitivity, specificity and stability and will be utilized for qualitative and quantitative detection of *H. bilis*.

【Key words】 *Helicobacter bilis*; QPCR; TaqMan probe

啮齿动物螺杆菌(rodent helicobacter)是指寄居于啮齿动物消化道的一群螺杆菌属细菌的总称, 目

[基金项目] 国家科技支撑计划 (2013BAK11B01)。

[作者简介] 伍妙梨 (1987 -), 女, 硕士, 研究方向: 预防兽医学。

[通讯作者] 郭鹏举, 研究员。E-mail: 1517727522@qq.com。

前从大鼠、小鼠、沙鼠等啮齿动物中已陆续分离到三十多种啮齿动物螺杆菌,其中重要的有胆汁螺杆菌 (*Helicobacter bilis*)、肝螺杆菌 (*Helicobacter hepatitis*)、啮齿类螺杆菌 (*Helicobacter rodentium*) 等^[1]。胆汁螺杆菌是啮齿类实验动物的重要致病菌之一,常呈隐性感染,其感染会严重影响实验动物的品质,而被国际实验动物理事会列为啮齿类实验动物必须排除的病原微生物^[2]。传统的胆汁螺杆菌的检测方法主要包括分离培养法、PCR 等。鉴于胆汁螺杆菌的生长条件苛刻,分离培养的成功率较低而不适用于临床鉴定;普通 PCR 技术通过对扩增后的产物进行电泳检测分析,虽然敏感性较高,但存在假阳性问题。实时荧光定量 PCR (qPCR) 通过实时检测荧光量的变化,获得不同样品达到一定荧光信号时所需的循环次数进而通过计算对模板进行准确定量,具有操作简单、结果直观、敏感性高、特异性强、重复性好等优点^[3]。本研究旨在建立一种灵敏度高、特异性强、快速准确检测胆汁螺杆菌的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及临床样本

胆汁螺杆菌 ATCC51630 购自美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC),大肠杆菌 DH-5α 菌株均由本实验室保存。临床样本为 SD 大鼠和野鼠的盲肠内容物,SD 大鼠来源于 2014 年本实验室收到广东省送检的 SD 大鼠,背景调查表明该 SD 大鼠曾饲养于普通环境,共 52 只。野鼠为褐家鼠,捕获于广州市某实验动物养殖场附近,共 25 只。无菌采集活体大鼠和野鼠的盲肠内容物,样本采集在本实验室的屏障环境实验间【SYXK(粤)2012-0122】进行,-20℃ 保存。

1.1.2 试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司;Premix Ex

Taq™ (Probe qPCR)、Premix Ex Taq™ Version2.0、pMD™19-T Vector 等均购自 TAKARA 公司。

1.1.3 仪器

ABI7500 荧光定量 PCR 仪,检测软件为 SDS1.4 版本。

1.1.4 引物及探针的设计合成

根据 NCBI 中胆汁螺杆菌 P17 基因序列的保守区域设计一对特异性 qPCR 引物(P17-F1、P17-R1)及探针(P17-probe),同时设计一对普通引物(P17-F2、P17-R2)扩增 P17 全长基因片段(表 1)。引物及探针均由上海立菲生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤提取胆汁螺杆菌的基因组 DNA,并用紫外分光光度计检测所获得的 DNA 的纯度及浓度。

1.2.2 *H. bilis* P17 基因全长 ORF 的 PCR 扩增

以抽提的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,取 2 μL 基因组 DNA 加入 2 μL 引物(10 μmol/L),25 μL Premix Ex Taq,加灭菌蒸馏水到反应总体积为 50 μL。95℃ 预变性 5 min 后,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,循环扩增 30 次,72℃ 终延伸 10 min,4℃ 保存。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测后用 DNA 纯化回收试剂盒回收,回收产物-20℃ 保存。

1.2.3 *H. bilis* P17 质粒标准品的制备

将扩增的 *H. bilis* P17 基因片段 PCR 产物纯化后进行 TA 克隆插入 pMD-19T 载体,并转化 DH5α 感受态细胞,筛选阳性克隆,经 PCR 鉴定后送 invitrogen 公司测序。将测序正确的阳性克隆增殖培养,提取重组质粒。通过紫外分光光度计测定质粒浓度,并根据公式: $C = (N \times 6.02 \times 10^{23}) / (MW \times 10^9)$ 计算质粒拷贝数。C 为每 μL 质粒中所含目的基因拷贝数;N 为质粒浓度,单位为 ng/μL;MW 为重组质粒分子量。

表 1 所用引物及探针

Tab.1 Primer and probe

Primer	Primer sequence	Amplicon Length
P17-F1	5'-TACCACTGGAATGTAAAAGGCA-3'	170bp
P17-R1	5'-CTTCTTTTAGCGTTACATACGGAGT-3'	
P17-F2	5'-ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAAC-3'	435bp
P17-R2	5'-CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCATCC-3'	
P17-probe	5'-(FAM)CCACAAGTCCATGCGCAACAGAAG(BHQ1)-3'	

1.2.4 qPCR 反应体系的建立和优化

根据 TAKARA Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)

的操作说明书配制 qPCR 反应体系,分别对引物浓度(0.1 $\mu\text{mol} \sim 1 \mu\text{mol}$),探针浓度(0.1 $\mu\text{mol} \sim 1 \mu\text{mol}$)、循环数(36 ~ 45 个循环)等条件进行优化,通过比较 Ct 值、荧光强度来判定优化结果。

1.2.5 敏感性试验及线性标准曲线的绘制

将 *H. bilis* P17 质粒标准品母液进行 10 倍梯度稀释,取 $10^8 \sim 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 这 8 个梯度稀释度的质粒作为 qPCR 反应模板,每个稀释度做 3 个重复,同时以 pMD-19T 空质粒为阴性对照,ddH₂O 为空白对照。通过实时荧光定量 PCR 仪自动绘制线性标准曲线。

1.2.6 qPCR 检测方法特异性分析

同时使用小家鼠螺旋杆菌(*H. muridarum*)、啮齿类螺旋杆菌(*H. rodentium*)、肝螺旋杆菌(*H. hepatitis*)、盲肠螺旋杆菌(*H. typhlonius*)、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌等细菌 DNA 作为模板进行 *H. bilis* qPCR 特异性检测,同时以 pMD-19T 空质粒为阴性对照,水作为空白对照,每个样品做 2 个重复。

1.2.7 qPCR 检测方法重复性分析

测定 5 个浓度梯度模板的 Ct 值,重复 5 次,通过计算 Ct 值的变异系数 CV 来评价检测方法的重复性。

1.2.8 *H. bilis* qPCR 检测方法的临床应用

用本研究建立的 qPCR 方法和普通 PCR 方法^[4]检测普通级别大鼠及野鼠的盲肠样品,并对比两种方法的检出率。

2 结果

2.1 pMD-HBP17 质粒的构建

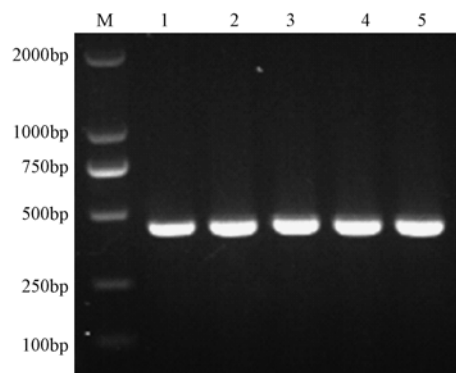
以胆汁螺旋杆菌的基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增 *H. bilis* P17 基因全长 ORF435 bp,通过 TA 克隆制备重组质粒。重组质粒经过 PCR 鉴定阳性(图 1)。阳性菌株经测序鉴定与 NCBI 中 *H. bilis* P17 基因片段序列一致。

2.2 qPCR 反应体系的建立

通过 ABI7500 系统随机软件 SDS1.4 分析 qPCR 结果。得出最佳反应条件是每 20 μL 反应体系中加入 10 μL Premix Ex Taq, 0.2 μL ROX Reference DyeII, 上下游引物各 0.2 μmol ,探针 0.1 μmol ,模板 2 μL 。ABI7500 反应程序为:95℃ 预变性 30 s 后进入 PCR 扩增阶段,95℃ 5 s,60℃ 34 s,同 40 个循环。其中 60℃ 34 s 为荧光收集阶段。

2.3 定量线性分析及敏感度检测

将 pMD-HBP17 质粒标准品进行 10 倍梯度稀释



注:M:DL2000DNA 分子质量标准;

1 ~ 5:pMD-HBP17 质粒阳性克隆菌落。

图 1 重组质粒 pMD-HBP17 的 PCR 鉴定

Note. DL2000 DNA Marker (M) and positive plasmid colony of pMD-HBP17 (1 ~ 5).

Fig.1 Result of PCR identification of the recombinant plasmid pMD-HBP17

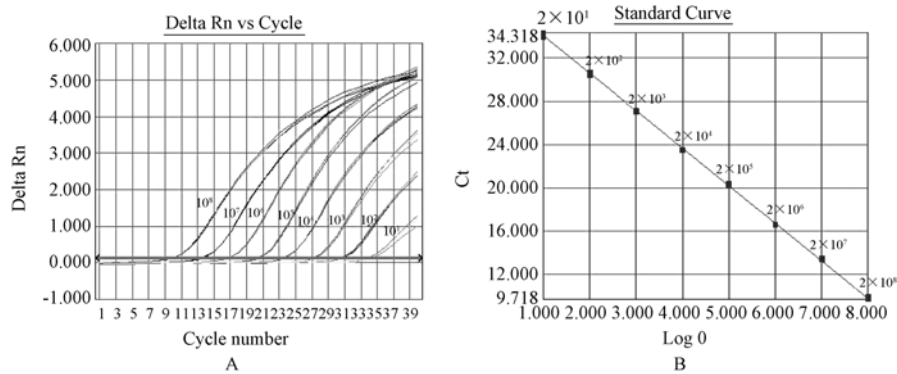
后,以 $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 稀释度作为模板进行 qPCR 反应,结果显示: $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 浓度之间,标准曲线线性较好,扩增曲线呈典型的 S 型(图 2),每组复孔间曲线拟合情况较好,相邻两组间起峰的循环数基本维持在 3 个循环左右,Ct 值落在 9 ~ 35 之间。标准曲线定量线性方程所得斜率为 -3.46,截距为 37.51,线性相关系数为 0.999。而 $2 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 组因模板浓度较低,接近 TaqMan 探针的临界检测浓度,复孔重复性不如前面 8 组,误差偏大,线性相关性不好,故排除。因此,本研究中标准品定量 20 拷贝以上能表现较好线性和相关性,故本方法检测的灵敏度为 20 个拷贝。定性判定可认为 Ct 值大于 35 为阴性,Ct 值小于 35 为阳性。

2.4 qPCR 检测方法特异性分析

对小家鼠螺旋杆菌(*H. muridarum*)、啮齿类螺旋杆菌(*H. rodentium*)、肝螺旋杆菌(*H. hepatitis*)、盲肠螺旋杆菌(*H. typhlonius*)、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌等进行检测,结果显示其他几种螺旋杆菌模板均未出现特异性扩增,对应扩增曲线均为平缓直线,而用 pMD-19T 空质粒作的阴性对照及水作的空白对照也均未出现特异性扩增,因此,该方法对胆汁螺旋杆菌核酸的检测是特异的(图 4)

2.5 qPCR 检测方法重复性分析

以 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 的模板重复测定 5 次,分别得到 5 个 Ct 值,计算 Ct 平均值、标准差和变异系数(表 2)。由表 2 可知,本方法检测重复性较好。



注:A:质粒标准品 qPCR 扩增荧光动力曲线;B: $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^1$ 拷贝的 pMD-HBP17 质粒标准品 10 倍倍比稀释的标准曲线。

图 2 pMD-HBP17 质粒标准品 qPCR 扩增荧光动力曲线及标准曲线

Note: A was fluorescence quantitative amplification plot of 10-fold serial dilution standard plasmid; B was standard curve obtained with serial dilution of the pMD-HBP17 standard plasmid from 2×10^8 copies/well to 2×10^1 copies/well.

Fig. 2 Real-time fluorescence quantitative amplification plot and standard curve of pMD-HBP17 standard plasmid

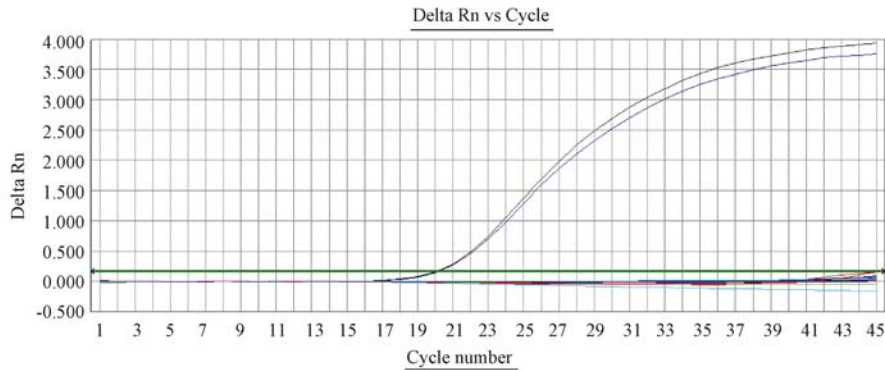


图 3 *H. bilis* qPCR 方法特异性检测结果

Fig. 3 The specificity evaluation of qPCR method

表 2 *H. bilis* qPCR 检测方法的重复性实验

Tab. 2 The repeatability evaluation of 10-fold serial dilution of pMD-HBP17 standard plasmid

模板 Template (Copies/well)	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	Ct5	Ct 平均值 (Ct mean values)	标准差 <i>s</i>	变异系 数 CV%
2×10^6	16.34	16.49	16.41	16.52	16.64	16.48	0.11	0.6%
2×10^5	20.21	20.26	20.14	20.39	20.48	20.29	0.14	0.6%
2×10^4	23.68	23.46	23.75	23.51	23.42	23.56	0.14	0.6%
2×10^3	27.12	27.15	27.24	27.39	27.19	27.21	0.11	0.3%
2×10^2	31.24	31.48	31.34	31.17	31.45	31.33	0.13	0.4%
2×10^1	35.05	34.98	35.12	35.07	35.18	35.08	0.08	0.2%

2.6 qPCR 检测方法的临床应用

对送检的 52 份 SD 大鼠盲肠样品和 25 份野鼠盲肠样品进行组织基因组提取后分别用 qPCR 方法和普通 PCR 方法检测样品中的胆汁螺杆菌,结果表

明,本研究建立的 qPCR 方法的检出率为 14.3%,而普通 PCR 方法的检出率为 7.8%,新建立的 qPCR 方法较普通 PCR 方法具有更高的检出率(表 3)。

表 3 qPCR 方法及普通 PCR 方法检测胆汁螺杆菌

Tab. 3 Detection of *Helicobacter bilis* by qPCR and PCR

试验方法 (methods)	qPCR		PCR	
	野鼠 (wild mice)	SD 大鼠 (SD rat)	野鼠 (wild mice)	SD 大鼠 (SD rat)
阳性样品 (positive sample)	3	8	1	5
检出率 (detection rate)	12.0%	15.4%	4.0%	9.6%
合计 (summation)	14.3%		7.8%	

3 讨论

啮齿动物螺杆菌为革兰氏阴性菌,生长要求苛刻,主要寄生于消化道,可导致肝胆疾病,并在肝炎发生中起促进作用,严重影响实验动物的质量^[5]。用携带啮齿类螺杆菌的实验动物进行相关疾病的发病机制、药效学研究、药品及保健品的安全性评估时,其试验结果将受到干扰^[6]。胆汁螺杆菌是一种典型而重要的螺杆菌,常以隐性感染形式普遍存在于大鼠、小鼠、沙鼠等啮齿动物的消化道中,与啮齿动物肝胆疾病、盲肠炎、结肠炎等的发生高度相关^[7-8]。研究指出,胆汁螺杆菌还与人类胆管癌、胆囊炎等肠道疾病的发生存在相关性,对人类具有潜在危害性^[9]。因此,螺杆菌在实验动物中的感染已经引起国内外研究者的高度重视,欧洲实验动物联盟已将其列为实验动物必须排除的病原菌,但我国因缺乏有效的检测方法,而尚未被列入实验动物质量国家标准,造成我国实验动物科研领域与国际水平的差距,进一步影响我国实验动物产业化,并对实验动物进出口带来不利影响^[10]。因此,建立一种简便、快速、高效、准确的检测啮齿类螺杆菌的方法对保证及提高实验动物质量至关重要。

在螺杆菌检测方法研究的早期,分离培养法与分子生物学方法因其可靠直接而成为螺杆菌诊断检测的首选方法,但因螺杆菌的生长条件苛刻,而阻碍了该检测方法的应用^[11]。随着分子生物学技术的发展,PCR 检测技术因高效、快速简便等优点而被广泛应用于检测螺杆菌。TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测技术因其特异性好、灵敏度高及可定量等优点近年来被广泛应用于多种病原微生物的检测^[12]。本研究中利用 TaqMan 探针技术建立胆汁螺杆菌 qPCR 检测方法,可用于胆汁螺的快速检测及定量。

本研究通过构建包含 *H. bilis*P17 基因序列的 pMD-HBP17 质粒,作为 DNA 定量标准品,并对标准品进行倍比稀释以作为反应模板,验证该检测方法的灵敏性。实验结果表明模板浓度在 $10^8 - 10^1$ 拷贝范围内,其相应 Ct 值具有良好的线性相关性,相关系数为 0.999,理论上该检测方法的定量准确性

到达 20 拷贝。用 qPCR 方法和既有的普通 PCR 方法对 77 份临床样品进行检测,结果表明 qPCR 检测方法较普通 PCR 方法具有更高的敏感性和检出率。

参考文献:

- [1] Hodzic E, McKisic M, Feng S, *et al.* Evaluation of diagnostic methods for *Helicobacter bilis* infection in laboratory mice[J]. *Comp Med*, 2001, 51(5): 406-412.
- [2] Flahou B, Haesebrouck F, Smet A, *et al.* Gastric and enterohepatic non-*Helicobacter pylori* *Helicobacters* [J]. *Helicobacter*, 2013, 18 Suppl 1: 66-72.
- [3] Javed S, Mejias-Luque R, Kalali B, *et al.* *Helicobacter bilis* gamma-glutamyltranspeptidase enhances inflammatory stress response via oxidative stress in colon epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73160.
- [4] Feng S, Ku K, Hodzic E, *et al.* Differential detection of five mouse-infecting *helicobacter* species by multiplex PCR[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(4): 531-536.
- [5] Ding C, Feng J, Xie JY, *et al.* Epidemiological investigation of *Helicobacter* in laboratory rats and mice by PCR[J]. *Journal of Yangzhou University*, 2012, 33(2): 6-10.
- [6] Nirah HS, Dangler CA, Robert PM, *et al.* *Helicobacter bilis* *Helicobacter rodentium* co-infection associated with diarrhea in a colony of scid mice[J]. *Laboratory Animal Science*, 1998, 48(5): 455-459.
- [7] Zhang LF, Liu X, Li H. Isolation and Identification of Rodent *Helicobacters*[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2007, 15(3): 215-219.
- [8] Miller CL, Muthupalani S, Shen ZL, *et al.* Isolation of *Helicobacter* spp. from mice with rectal prolapses[J]. *Comp Med*, 2014, 64(3): 171-178.
- [9] Pandey M, Mishra RR, Dixit R, *et al.* *Helicobacter bilis* in human gallbladder cancer: results of a case-control study and a meta-analysis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11(2): 343-347.
- [10] 林祥梅. 实验动物与出入境检验检疫[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21: 34-38.
- [11] Zheng Q, Bing F, Zheng M, *et al.* Identification of *Helicobacter hepaticus* firstly isolated in China from mice [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2009, 25(3): 210-213.
- [12] 王静, 张钰, 闵凡贵, 等. 猴免疫缺陷病毒(SIV)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 09: 70-75

[修回日期]2015-08-18