

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.14

牛巴贝斯虫实时荧光 PCR 检测方法的建立

刘启生¹, 王振宝², 王真¹, 哈森², 张玉婷¹, 巴音查汗^{1*}

(1. 新疆农业大学 动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 伊犁出入境检验检疫局, 新疆 伊犁 835000)

摘要: 为建立牛巴贝斯虫(*B. bovis*)的 TaqMan 实时荧光 PCR 检测方法, 本研究根据 GenBank 中 *B. bovis* 的 18S rRNA 基因保守序列, 设计引物和 TaqMan 探针, 通过优化反应体系, 建立检测 *B. bovis* 的实时荧光 PCR 方法。试验结果表明: 实时荧光 PCR 对靶基因的最低检测值为 1.31×10^1 copies/ μ L, 比常规 PCR 的敏感性高 1 000 倍; 而且与牛的其他血液原虫无交叉反应; 组内及组间重复性试验的变异系数均小于 3%, 具有良好的重复性; 在 23 份被检样品中, 实时荧光 PCR 和常规 PCR 的检出率分别为 52.17% 和 30.43%。该检测方法的建立为 *B. bovis* 的检测提供了一种快速、敏感、特异的技术手段。

关键词: 牛巴贝斯虫; 实时荧光 PCR; TaqMan 探针; 检测

中图分类号: S852.72

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0058-04

Development of real-time PCR assay for detection of *Babesia bovis*

LIU Qi-sheng¹, WANG Zhen-bao², WANG Zhen¹, HA Sen², ZHANG Yu-ting¹, Bayinchahan^{1*}

(1. College of Animal Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Yili Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yili 835000, China)

Abstract: To detect the *Babesia bovis*, a real-time PCR method was established with a pair of primers and a TaqMan probe designed according to the conserved sequence of 18S rRNA genes in GenBank. The results showed that: the limit detection of real-time PCR was about 1.31×10^1 copies/ μ L for the target gene which was 1,000 times higher sensitivity than conventional PCR, and no cross-reaction with other piroplasmasida in cattle. The reproducibility tests in inter-assay and intra-assay indicated that the coefficients of variation were less than 3%. A total of 23 clinical samples were tested by the real-time PCR comparing with conventional PCR, and positive rates were 52.17% (12/23) and 30.43% (7/23), respectively. The establishment of the real-time PCR method for detection of bovine *Babesia* was sensitive, specific and rapid detection technology, which is provided a assay for the tick-borne bovine piroplasmosis detection.

Key words: *Babesia bovis*; real-time PCR; TaqMan probe; detection

牛巴贝斯虫(*Babesia bovis*)是一种蜱媒血液原虫, 牛属动物感染后, 出现发热、贫血、血红蛋白尿、共济失调等症状, 严重时引起死亡, 给畜牧业造成严重经济损失^[1]。*B. bovis*与双芽巴贝斯虫(*B. bigemina*)、牛环形泰勒虫(*Theileria annulata*)等梨形虫(牛焦虫)常常混合感染牛只, 严重危害养牛业

的健康发展^[2,3], 梨形虫的混合感染和隐性感染对牛血液原虫病的防治带来了一定困难。

目前, 国外学者对 *B. bovis* 进行分子生物学检测的报道较多, 常规 PCR、套式 PCR 和基于 SYBR Green 染料的实时荧光 PCR 在 *B. bovis* 的检测方面均有应用^[4,6]。常规 PCR 存在灵敏度低, 检测周期较长

*Corresponding author

收稿日期: 2012-07-30

基金项目: 国家自然科学基金(30960282); 国家自然科学基金会(NSFC)-新疆联合基金(U1170301)

作者简介: 刘启生(1985-), 男, 山东聊城人, 硕士研究生, 主要从事寄生虫及其分子生物学研究。

* 通信作者: E-mail: bynch@hotmail.com

等缺点; 套式 PCR 灵敏度高, 但两步的 PCR 反应繁琐、易污染, 不适用于大规模的流行病学调查; 实时荧光 PCR 技术敏感性高、特异性强、检测速度快, 与常规 PCR 相比不存在交叉污染和核酸染料对人体的危害等缺点, 近年来逐渐应用于各种病原体的定性检测^[7-10]。本研究建立检测 *B.bovis* 的实时荧光 PCR 方法, 为 *B.bovis* 的早期、快速检测, 梨形虫病的防控及分子流行病学研究提供了一种新的检测手段。

1 材料和方法

1.1 标准虫株 *B.bovis*、*B.bigemina* 虫株由中国农业科学院兰州兽医研究所提供; *T.annulata* 虫株由本实验室分离保存。

1.2 主要试剂 全血 DNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; *Taq* DNA 聚合酶、 $MgCl_2$ 、dNTPs、DL2000 Marker、胶回收试剂盒、pMD19-T 载体、质粒提取试剂盒等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 引物与探针 通过比对 GenBank 中 *B.bovis* 18S rRNA 基因的保守序列, 使用 Primer Premier 5 和 Primer Express 3.0 软件设计一对引物和一条探针: BboF: 5'-GTGTTTCAAGCAGGTTTCGC-3'; BboR: 5'-CGT GCGTCATCGACAAATCT-3'; BboP: 5'-FAM-TGAG CATGGAATAACCTTGTATGACCCT-TAMRA-3', 目的片段大小为 160 bp。引物和探针均由北京鼎国生物技术有限公司合成。

1.4 虫体 DNA 提取及标准品制备 采用全血 DNA 提取试剂盒提取 *B.bovis* DNA, 应用特异性引物进行常规 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的片段连接至 pMD19-T 载体, 构建重组质粒并由北京鼎国生物技术有限公司测序, 将鉴定正确的重组质粒作为标准阳性模板并测定浓度。

1.5 荧光定量 PCR 反应体系和反应条件的优化 以标准品为模板, 对 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、探针退火延伸温度和时间进行优化。

1.6 标准曲线的建立和敏感性试验 将标准阳性重组质粒经微量核酸蛋白分析仪测定浓度, 用 TE 缓冲液稀释成 10 倍系列梯度浓度 (1.31×10^8 copies/ μ L ~ 1.31×10^0 copies/ μ L) 作为模板, 于 -20°C 保存。按优化好的体系条件进行实时荧光 PCR, 绘制标准曲线。同时以上述梯度浓度模板进行常规 PCR 试验,

比较两者的灵敏度。

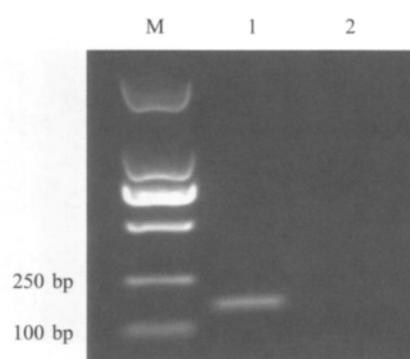
1.7 特异性试验 提取 *B.bovis*、*B.bigemina*、*T.annulata* 和健康牛血的 DNA 作为模板, 用双蒸水做为空白对照, 进行实时荧光 PCR 扩增, 评价试验的特异性。

1.8 稳定性试验 取 4 个不同浓度的样品作为模板进行重复性试验, 每个浓度做 4 个平行, 重复 3 次。收集数据, 计算组内、组间变异系数, 评价试验的稳定性。

1.9 临床样品的检测 从分别采自吐鲁番、伊犁的 23 份疑似病例血液样品提取 DNA, 进行实时荧光 PCR 检测, 同时对样品进行常规 PCR 检测, 评价实时荧光 PCR 的临床应用性。

2 结果

2.1 阳性模板的鉴定 以 *B.bovis* DNA 为模板经常规 PCR 反应, 扩增的目的片段与预期 (160 bp) 一致 (图 1), 阳性重组质粒经测序比对, 与 GenBank 中登录的 *B.bovis* 18S rRNA 基因序列的同源性达到 98% ~ 100%。



M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR product; 2: Negative control

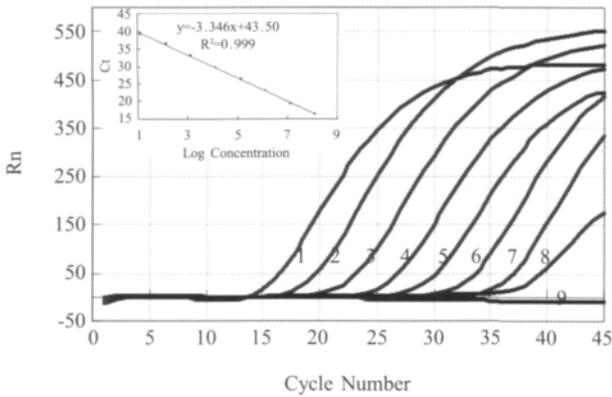
图 1 阳性模板的鉴定

Fig.1 Identification of the positive template

2.2 荧光定量 PCR 反应体系和条件的确定 经优化建立如下反应体系: $10 \times$ PCR buffer (Mg^{2+} free) $2.5 \mu\text{L}$, $MgCl_2$ (25 mmol) $3.5 \mu\text{L}$, dNTPs (10 mmol) $0.5 \mu\text{L}$, BboF/BboR ($10 \mu\text{mol}$) 各 $1 \mu\text{L}$, *TaqMan* 探针 ($10 \mu\text{mol}$) $0.5 \mu\text{L}$, *Taq* DNA 聚合酶 ($5 \text{ u}/\mu\text{L}$) $0.5 \mu\text{L}$, 模板 DNA $1 \mu\text{L}$, 加灭菌双蒸水至 $25 \mu\text{L}$ 。反应条件为: 95°C 2 min; 95°C 10 s; 55°C 60 s, 45 个循环; 每个循环延伸结束时采集荧光信号。

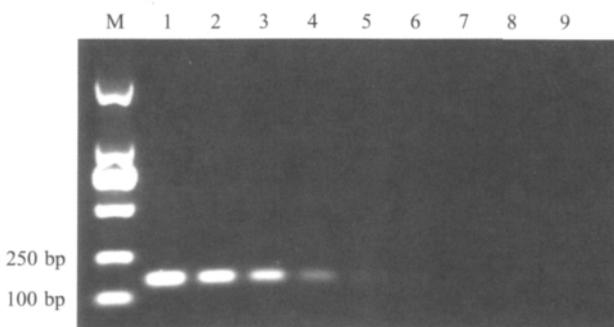
2.3 标准曲线及实时荧光 PCR 灵敏度 以 10 倍系

列梯度浓度(1.31×10^8 copies/ μ L \sim 1.31×10^0 copies/ μ L) 的阳性重组质粒作为模板进行实时荧光 PCR 反应, 浓度为 1.31×10^1 copies/ μ L 时依然有扩增曲线(图 2)。模板浓度与 CT 值呈良好的线性关系, 相关系数 $R^2=0.999$, 回归方程为: $CT=-3.346lg(X)+43.50$ 。扩增效率为 99%, 符合实时荧光 PCR 的试验预期结果。常规 PCR 的检测浓度下限为 1.31×10^4 copies/ μ L (图 3), 灵敏度远低于实时荧光 PCR。



1-9: 1.31×10^8 copies/ μ L- 1.31×10^0 copies/ μ L

图 2 实时荧光 PCR 标准曲线和动力学曲线
Fig.2 Standard and dynamic curve of real-time PCR



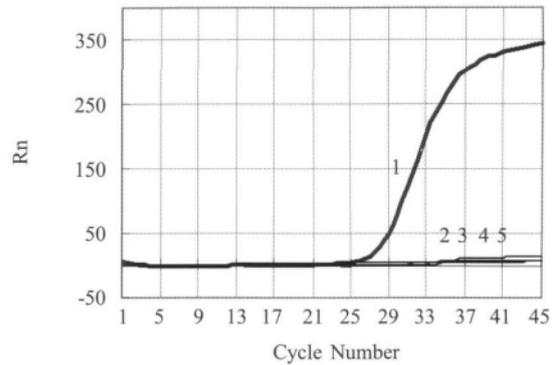
M: DL2000 DNA Marker; 1-8: 1.31×10^8 copies/ μ L-
 1.31×10^0 copies/ μ L; 9: Negative control

图 3 常规 PCR 试验的灵敏度
Fig.3 Sensitivity test of conventional PCR

2.4 特异性试验 应用实时荧光 PCR 进行特异性试验显示, *B. bovis* 出现特异性的扩增曲线, *B. bigemina*、*T. annulata*、健康牛血和空白对照均未产生特异性荧光信号。结果表明建立的实时荧光 PCR 具有良好的特异性(图 4)。

2.5 稳定性试验 选取 1.31×10^8 copies/ μ L、 1.31×10^6 copies/ μ L、 1.31×10^4 copies/ μ L、 1.31×10^2 copies/ μ L 4 个浓度的阳性模板进行组内和组间重复性试验, 计算出组内组间 CT 值的变异系数分别为 0.35%~

1.70%、0.32%~0.60% (表 1), 均小于 3%, 表明该方法具有良好的重复性。



1: *B. bovis*; 2: *B. bigemina*; 3: *T. annulata*;
4: Negative cattle blood; 5: Blank

图 4 实时荧光 PCR 特异性试验扩增曲线
Fig.4 Specificity test curve of real-time PCR

表 1 实时荧光 PCR 的重复性试验

Table 1 The reproducibility test of real-time PCR

模板浓度 Concentration of template (copies/ μ L)	n	组内重复性试验 Intra-assay		n	组间重复性试验 Inter-assay	
		平均值 $\bar{X} \pm SD$	变异系数 CV (%)		平均值 $\bar{X} \pm SD$	变异系数 CV (%)
1.31×10^8	4	16.34 \pm 0.06	0.35%	3	16.25 \pm 0.07	0.45%
1.31×10^6	4	23.00 \pm 0.28	1.24%	3	22.92 \pm 0.07	0.32%
1.31×10^4	4	29.98 \pm 0.11	0.36%	3	29.83 \pm 0.15	0.49%
1.31×10^2	4	36.80 \pm 0.63	1.70%	3	36.91 \pm 0.22	0.60%

2.6 临床样品的检测 将 23 份临床全血样品分别应用实时荧光 PCR 和常规 PCR 进行检测, 结果显示, 实时荧光 PCR 能够检出 12 份阳性, 常规 PCR 只检出 7 份阳性, 并且常规 PCR 检出的 7 份阳性样品荧光 PCR 均显示为阳性, 实时荧光 PCR 和常规 PCR 的检出率分别为 52.17% 和 30.43%, 表明该实时荧光 PCR 有良好的临床灵敏性和应用性。

3 讨论

目前, 牛巴贝斯虫病的诊断一般为血涂片镜检, 该方法虽然方便直观, 但敏感性差, 检出率低, 对低水平感染检测不能适用; 间接荧光抗体试验(IFAT)和酶联免疫法(ELISA)等血清学方法应用较为广泛, 但存在不能区分耐过动物、不易区分相近虫种的交叉感染的缺点^[11]; 实时荧光 PCR 方法可以直接检测病原核酸, 准确性高, 对隐性感染和低水平感染具有良好的检出率。实时荧光 PCR 主要分为染料法和探针法, 探针法的优势在于在上下游引物之间引入一条与目的模板特异性结合的荧光标记探针, 增强

了实时荧光 PCR 的特异性和敏感性。本研究针对 *B. bovis* 18S rRNA 基因设计引物和 TaqMan 探针, 建立了 *B. bovis* 实时荧光 PCR 检测方法, 该方法最低可以检测 1.3×10^1 copies 靶基因, 对低水平感染有更好的检出率, 敏感性较常规 PCR 高 1 000 倍; 与其他几种牛属动物易感血液原虫无交叉反应, 特异性强, 能够准确快速定性检测; 组内和组间试验的变异系数分别为 0.35 % ~ 1.70 %、0.32 % ~ 0.60 %, 方法的稳定性好; 临床样品检测表明该方法具有良好的应用性。

综上所述, 本研究建立的实时荧光 PCR 检测方法, 可以灵敏、特异的快速定性检测 *B. bovis*, 该方法的建立将为蜱传原虫病的流行病学调查提供快速有效的检测手段, 为蜱媒病的相关研究提供有效的技术支持。

参考文献:

- [1] Homer M J, Aguilar-Delfin I, Telford S R, et al. Babesiosis [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(3): 451-469.
- [2] 吴永红, 刘玲, 王真, 等. 南疆部分散养户牛场梨形虫及其媒介蜱感染情况的调查[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(10): 1918-1922.
- [3] 臧鹏伟, 王伟东, 徐魁梧, 等. 南京地区新生奶牛犊的巴贝斯虫病病例分析[J]. 畜牧兽医, 2007, 39: 41-42.
- [4] Fahrimal Y, Goff W L, Jasmer, D P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(6): 1374-1379.
- [5] AbouLaila M, Yokoyama N, Igarashi I. Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood [J]. Vet Parasitol, 2010, 172: 65-70.
- [6] Buling A, Criado-Fornelio A, Asenzo G, et al. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina* [J]. Vet Parasitol, 2007, 147: 16-25.
- [7] 周霞, 剡根强. 荧光定量 PCR 技术及其在预防兽医学研究中的应用[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2005, 23(5): 623-627.
- [8] Higgins J A, Fayer R, Trout J M, et al. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum* [J]. J Microbiol Methods, 2001, 47(3): 323-337.
- [9] 王群, 郑小龙, 朱来华, 等. 马媾疫锥虫 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(9): 724-727.
- [10] 蒋春燕, 王泰健, 王琴, 等. 实时荧光定量 PCR 技术[J]. 动物医学进展, 2005, 26(12): 97-101.
- [11] Livio M C J, Elida M L R, Olindo A M F, et al. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites [J]. Vet Parasitol, 2006, 139: 231-236.

(本文编辑: 李 爽)