

# 荧光定量 PCR 检测梅毒螺旋体方法的建立及初步应用\*

赵丹<sup>1</sup>, 杨小猛<sup>2</sup>, 陈倩瑜<sup>1</sup>, 欧彩兰<sup>1</sup>, 林凌云<sup>3</sup> (1. 广东省深圳市罗湖区慢性病防治院 518023; 2. 广东省深圳市罗湖区妇幼保健院 518019; 3. 广东省深圳市第一劳动教养管理所 518020)

**【摘要】目的** 采用二聚体蝎型探针技术建立一种高敏感性和特异性的检测梅毒螺旋体(TP)的荧光定量聚合酶链反应(PCR)方法。**方法** 根据 TP 特异性外膜蛋白 Gpd 的基因序列设计引物和荧光探针,采用基因工程技术构建可用于 TP 定量的标准品,优化荧光定量 PCR 的反应体系和反应条件,建立检测 TP 的二聚体蝎型探针定量 PCR。采用本研究建立方法和商品化荧光定量 PCR 试剂盒检测 40 例临床标本,对比分析检测结果的统计学差异。**结果** 成功构建了 TP 重组质粒标准品和 TP 的二聚体蝎型探针定量 PCR,该方法线性范围为  $10^1 \sim 10^8$  copy/mL,灵敏度为 10 copy/mL,特异性和敏感性均为 100.0%;二聚体蝎型探针定量 PCR 对疑似梅毒病例阳性检出率显著高于目前商品化 Taqman 荧光定量 PCR 试剂盒(82.5% vs 62.5%,  $P < 0.05$ )。**结论** 成功建立了二聚体蝎型探针荧光定量 PCR 快速检测 TP 的方法,为临床上 TP 的早期诊断和防控奠定了基础。

**【关键词】** 二聚体蝎型探针; 荧光定量聚合酶链反应; 梅毒螺旋体

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.03.015 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)03-0324-03

## Establishment and clinical application of fluorescent quantitation PCR for rapid detection of treponema pallidum\*

ZHAO Dan<sup>1</sup>, YANG Xiao-meng<sup>2</sup>, CHEN Qian-yu<sup>1</sup>, OU Cai-lan<sup>1</sup>, LIN Ling-yun<sup>3</sup> (1. Luohu Chronic Disease Prevention and Cure Hospital, Shenzhen, Guangdong 518023, China; 2. Luohu Maternity and Child Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518019, China; 3. Shenzhen First Reeducation Unit, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

**【Abstract】Objective** To establish a sensitive and specific fluorescent quantitation PCR (FQ-PCR) by using duplex scorpion primer for rapid detection of treponema pallidum (TP). **Methods** Primer and fluorescent probe were designed based on the gene order of TP outer membrane protein Gpd. Quantitative standard preparation of TP was constructed by using gene recombination. Duplex scorpion primer FQ-PCR for rapid detection of TP was established by optimizing the reaction system and reaction condition. Totally 40 suspected cases were detected by our FQ-PCR and commercial FQ-PCR respectively and the difference was analyzed. **Results** Duplex scorpion primer FQ-PCR for rapid detection of TP was established successfully. The linear range of the method was  $10^1 - 10^8$  copy/mL and the sensitivity was 10 copy/mL, susceptibility and specificity were 100.0%. The positive detection rate of the suspected cases by our method was sharply higher than that by commercial FQ-PCR kit (82.5% vs 62.5%,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Duplex scorpion primer FQ-PCR for rapid detection of TP was established successfully, which could be used for early diagnosis and preventive control of TP.

**【Key words】** duplex scorpion primer; fluorescent quantitation PCR; treponema pallidum

梅毒是由梅毒螺旋体(TP)引起的,严重危害人类健康的性传播疾病之一,近年来我国梅毒发病率呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。梅毒不仅可以在普通人群中水平传播,还可以通过母婴垂直传播,引起先天性梅毒。早诊断、早治疗对控制梅毒蔓延至关重要<sup>[2]</sup>。目前国内外 TP 的检测方法主要有病原体检测法和血清学试验;病原体检测法是目前最特异、最准确的诊断方法,但灵敏度低;非 TP 抗原血清学试验敏感性高而特异性较低;TP 抗原血清学试验敏感性和特异性都很高,但不能反映梅毒治疗效果及治愈情况,也不能判断其是否具有传染性。分子生物学诊断技术具有快速、敏感、特异等优点,将可能提高 TP 的诊断效率<sup>[3]</sup>。二聚体蝎型探针定量技术是目前发展迅速的分子生物学诊断技术之一,与现有的基于 Taqman 荧光探针技术的聚合酶链反应(PCR)比较,该技术具有敏感度更高、成本更低等特点<sup>[4]</sup>。目前国内外少见二聚体蝎型探针定量技术用于 TP 的报道,本研究拟采用该技术建立新型的 TP 荧光定量 PCR。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

**1.1.1 标本来源** 按《梅毒诊断标准(WS 273-2007)》收集的 40 例疑似病例和 22 例确诊病例患者血清标本均来自深圳市罗湖区第一劳动教养管理所在押劳教人员;8 份 TP 阴性血清标本来自健康体检者。

**1.1.2 菌株和质粒** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本课题组保存,原核表达载体 pET28a 购于美国 GE 公司。

**1.1.3 试剂与仪器** 热启动 Taq 酶、UNG 酶、dNTPs、缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、限制性内切酶 BamH I 及 Hind III 和 pMD18-T 载体连接系统购自大连宝生物公司;琼脂糖、EB 和胶回收试剂盒购自北京博凌科为公司;Marker 购自美国 MBI 公司;梅毒 Taqman 荧光定量 PCR 试剂盒购自广州中山达安公司;胰蛋白胨、酵母提取物购自南京森贝伽公司;质粒抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司。ABI-7500 荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司

\* 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(医疗卫生类)(201203196)。

作者简介:赵丹,女,博士,副主任技师,主要从事临床检验诊断学研究。

产品。

1.2 方法

1.2.1 引物和探针设计合成 以 TP 特异性外膜蛋白 Gpd 基因序列为模板,扩增序列长 164 bp。采用 Primer-Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) 设计特异性探针和引物,并由上海生工生物公司合成和标记。普通 PCR 上游引物 F1:5'-GCC AGC GCT TTC CTC TTT G-3',下游引物 R1:5'-CGC TGC GAT GTC TTT TCC TT-3'。二聚体蝎型探针上游引物和标记荧光报告基团的核苷酸链由线性多聚体(HEG)连接为 F2:5'-FAM-TGG TTT TAG GCT GCA CAC TTT HEG GCC AGC GCT TTC CTC TTT G-3',标记猝灭基团的互补链为 5'-AAA GTG TGC AGC CTA AAA CCA DAB CYL-3',下游引物 R2:5'-CGC TGC GAT GTC TTT TCC TT-3'。

1.2.2 标本处理 取疑似病例和确诊病例患者及健康体检者血清 100 μL,加入等量 DNA 浓缩试剂,振荡混匀,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 20 μL DNA 提取液,振荡混匀并瞬时离心,置 100 °C 干热孵育器中 10 min,立即放入 4 °C 离心机,10 000 r/min 离心 10 min,留取上清液标本备用。取确诊病例患者血清 DNA 标本用于构建标准品质粒。

1.2.3 标准品质粒 pET28a-Gpd 的构建 反应体系总体积为 30 μL:梅毒螺旋体 DNA 模板 2 μL、普通 PCR 上、下游引物各 3 μL、缓冲液 3 μL、MgCl<sub>2</sub> 2 μL、dNTP 3 μL、Taq 酶 0.5 μL、无 DNA 酶去离子水 16.5 μL。循环参数为 95 °C 预变性 5 min;95 °C 30 s,59 °C 30 s,72 °C 30 s,循环 35 次;72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经电泳初步鉴定,采用胶回收试剂盒回收目的 DNA,定量后克隆到 T 载体并转化入大肠杆菌 DH5α,用异丙基硫代半乳糖苷/5-溴-4 氯-3-吡啶-β 半乳糖苷/氨苄青霉素平板筛选出阳性克隆,含 Amp 60 μg/mL 的 LB 肉汤增菌,提取质粒,经 BamH I 和 HindIII 双酶切和 PCR 鉴定。

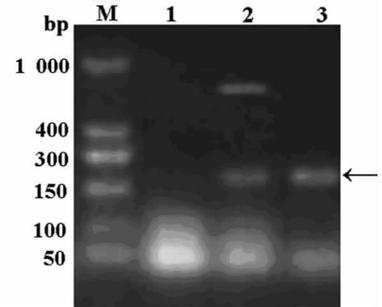
1.2.4 二聚体蝎型探针定量 PCR 体系和循环参数的优化 本研究拟扩增模板为 164 bp,结合二聚体蝎型探针的特性,选用变性和退火二步循环法。参考文献[5]报道,二聚体蝎型探针可采用 PCR 快循环,其循环参数设置应满足 PCR 反应时间最短但不影响荧光曲线的要求。为节约试剂成本,本研究反应体系总体积为 20 μL,DNA 模板 2 μL,设置镁离子浓度梯度、探针浓度梯度、报告探针和淬灭探针浓度比梯度,并优化组合。通过分析 PCR 产物的电泳条带,实时荧光定量 PCR 的荧光曲线的背景、荧光值的峰值、信噪比和扩增曲线的形态来评价反应体系,从而最终建立最佳的荧光定量 PCR 反应体系。

1.2.5 方法学评价 (1)标准曲线及线性范围。采用含 Amp 的 LB 肉汤增菌培养阳性克隆大肠杆菌,收集细菌并抽提质粒,定量后进行 10 倍梯度稀释得系列浓度的标准品:10<sup>1</sup>~10<sup>8</sup> copy/mL,以该序列浓度的标准品为模板进行荧光定量反应,ABI-7500 PCR 仪自动生成标准曲线。根据标准曲线的线性,以保持相关系数大于或等于 0.99 的稀释浓度确定本方法的线性范围。(2)灵敏度。采用双蒸水将质粒按 10 倍梯度稀释至 10 copy/mL,用双蒸水做无模板对照,进行荧光定量反应,以能区别于无模板对照的最低质粒浓度即为本方法的灵敏度。(3)特异性和敏感性。采用建立的方法检测 22 例确诊病例患者和 8 例 TP 阴性血清标本,计算本方法的特异性、敏感性、阳性预测值、阴性预测值和总有效率。(4)方法学比较。以 Taqman 定量 PCR 为比方法,与二聚体蝎型探针方法同时检测 40 份疑似梅毒患者血清标本,统计分析试验结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件分析试验数据,二聚体蝎型探针定量 PCR 和 Taqman 定量 PCR 检测结果比较采用配对  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的构建和鉴定 质粒经 BamH I 和 HindIII 双酶切,其理论酶切产物为 164 bp,产物电泳后条带位置与理论值相符。以质粒为模板,采用构建标准品的引物按原反应体系进行 PCR 扩增,产物电泳后条带位置与理论值亦相符(图 1)。



注:M 为 Marker;1 为阴性对照;2 为双酶切;3 为 PCR 扩增。

图 1 重组质粒鉴定的电泳图

2.2 荧光定量 PCR 反应体系和循环参数 经过优化反应体系 and 循环参数,本研究最佳荧光反应体系如下:总体积 20 μL、模板 2 μL、上游引物和报告探针 F2(5 μmol/L)2 μL、下游引物 R2(5 μmol/L)2 μL、淬灭探针(25 μmol/L)2 μL、缓冲液(10×)2 μL、dNTP(2.5 mmol/L)2 μL、MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)2 μL、Taq 酶(5 U/μL)0.2 μL、UNG 酶 0.1 μL、无 DNA 酶 H<sub>2</sub>O 5.7 μL。最佳循环参数:93 °C 2 min 预变性;93 °C 45 s → 55 °C 30 s 并采集荧光信号;共 40 个循环。

2.3 方法学评价 (1)线性范围:二聚体蝎型探针方法在 10<sup>1</sup>~10<sup>8</sup> copy/mL 质粒浓度范围内线性良好,标准曲线  $Y = -2.45X + 12.67, r = 0.9923$ 。(2)灵敏度:二聚体蝎型探针方法能区别于无模板对照的最低模板浓度(灵敏度)为 10 copy/mL。(3)特异性和敏感性:二聚体蝎型探针方法检测 22 例确诊病例均为阳性,检测 8 例健康体检者均为阴性,其敏感性、特异性、阳性预示值、阴性预示值和总有效率均为 100.0%。

2.4 二聚体蝎型探针方法与 Taqman 荧光定量 PCR 结果的比较 以 Taqman 定量方法和二聚体蝎型探针方法同时检测 40 例疑似梅毒患者血清标本,其中 25 例标本两种方法均为阳性,8 例标本 Taqman 荧光定量 PCR 检测为阴性,而蝎型探针方法定量结果分别为:1.28 × 10<sup>2</sup>、0.53 × 10<sup>2</sup>、1.21 × 10<sup>1</sup>、1.51 × 10<sup>2</sup>、1.18 × 10<sup>1</sup>、1.26 × 10<sup>2</sup>、7.82 × 10<sup>1</sup>、1.33 × 10<sup>2</sup> copy/mL,7 例标本两种方法检测结果均为阴性。二聚体蝎型探针方法阳性检出率为 82.5%,Taqman 定量方法阳性检出率为 62.5%,前者显著高于后者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 两种定量 PCR 检测 40 例疑似病例血清的结果(n)

Taqman 荧光定量 PCR	二聚体蝎型探针方法		合计
	阳性	阴性	
阳性	25	0	25
阴性	8	7	15
合计	33	7	40

### 3 讨 论

梅毒是由 TP 引起的,严重危害人类健康的性传播疾病之一,主要通过性接触和血液传播。梅毒是一种传染性强且危害性大的疾病,不仅可以在普通人群中水平传播,还可以经母胎垂直传播,引起先天性梅毒<sup>[2,6]</sup>。因此,早诊断、早治疗对控制梅毒蔓延至关重要,而选择敏感性高、特异性强的检测方法将有助于梅毒(特别是早期梅毒)诊断。

国内外目前检测 TP 主要有以下几种方法:(1)病原体检测,包括暗视野显微镜检查、银染色法、荧光抗体染色法等直接检测 TP 的方法。(2)血清学试验,包括性病研究实验室试验、快速血浆反应素环状卡片试验、不加热血清反应素试验和甲苯胺红不加热血清试验等非特异性血清学试验,以及梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验、梅毒螺旋体血球凝集试验、TP-ELISA 和免疫印迹等特异性血清学试验。(3)基因诊断技术。这些试验方法各有其优缺点:病原体检测法直接观察分泌物中的 TP,可直接诊断梅毒,是目前最特异、最准确的诊断方法,但灵敏度低<sup>[7]</sup>。非特异性血清学试验检测反应素等非特异性抗体,敏感性高而特异性较低。特异性血清学试验检测 TP 抗体,敏感性和特异性都很高,可作为确认试验,但不能反映梅毒治疗效果及治愈情况,也不能判断是否具有传染性,仅适合于大批量的实验室检测<sup>[8]</sup>。基因诊断技术检测 TP DNA,有很强的特异性和很高的敏感性,但目前国内 PCR 试剂盒质量有待改进,同时试剂成本较高<sup>[4,9]</sup>。

PCR 可以在 TP 抗体产生前几周检测出 TP DNA,即窗口期隐性感染;实时荧光定量 PCR 具有实时监测、绝对定量和高通量检测的优势,克服了传统 TP 检测技术敏感性低、定量困难、假阳性率高等缺点<sup>[4]</sup>。常用的 Taqman 探针技术存在探针标记和纯化难度高、Taq 酶要求高且反应时间较长等不足之处。Solinas 等<sup>[10]</sup>使用二聚体蝎型探针进行 SNP 分析,这种探针通过一个 HEG 连接在引物 5'端,探针可与该引物扩增后的新生链互补,荧光报告基团标记在探针 5'端;另有一条单独的猝灭链与探针互补,猝灭基团标记在猝灭链 3'端。无特异性产物时,猝灭链和探针杂交,从而无荧光产生;有特异性产物时,由于分子内部杂交比分子间杂交更容易,探针更易杂交到产物链上并产生特异荧光。

本研究首次建立了二聚体蝎型探针荧光定量 PCR 检测 TP 的方法,并对该方法进行了初步的方法学评价,其线性范围为  $10^1 \sim 10^8$  copy/mL,灵敏度为 10 copy/mL,特异性和敏感性均为 100.0%。二聚体蝎型探针方法对疑似梅毒患者阳性

检出率显著高于常用的 Taqman 荧光定量 PCR。后续试剂盒研发的优化试验中作者进一步将对该方法的批内、批间重复性,反应体系稳定性,以及病原体检测特异性等参数进行方法学评价。二聚体蝎型探针定量 PCR 为临床上早期诊断 TP 和控制其蔓延奠定了试验和理论基础,可在今后 TP 的监测等方面开展应用。

### 参考文献

- [1] 胡冰雪,曲波,刘洁,等. 中国 1990~2011 年梅毒流行特征分析与趋势预测[J]. 现代预防医学,2014,41(6):961-963.
- [2] 周动机,谢慧,张遇娴,等. 不同孕期治疗对妊娠梅毒分娩的预后影响[J]. 皮肤性病诊疗学杂志,2013,20(2):121-123.
- [3] 刘燕平,吴忠勇,吴建松. 荧光定量聚合酶链反应技术在梅毒患者检测中的应用价值[J]. 当代医学,2013,19(18):115-116.
- [4] Harris CL, Sanchez-Vargas IJ, Olson KE, et al. Polymerase chain displacement reaction[J]. Biotechniques, 2013, 54(2):95-99.
- [5] 陈峰,吴尔翔,丁锁顺,等. 二聚体蝎型探针荧光定量 PCR 快速检测志贺菌方法的建立及初步应用[J]. 中国人兽共患病学报,2013,29(9):886-890.
- [6] 张军,刘涛,盛晓红. 15 436 例住院患者梅毒抗体检测结果分析[J]. 检验医学与临床,2013,10(13):1735-1736.
- [7] 高泽勤,李新科,朱夫俊. 梅毒螺旋体感染四种血清学检测方法的临床评价[J]. 安徽预防医学杂志,2014,20(2):88-90.
- [8] 郭家权,洪敏,林永前. 酶联免疫吸附法检测与甲苯胺红不加热血清试验在梅毒检验中应用价值的比较[J]. 广东医学,2014,35(5):738-740.
- [9] 刘新平,周方红. 临床常用三种梅毒检测方法的实验室比较[J]. 检验医学与临床,2012,9(20):2633-2634.
- [10] Solinas A, Brown LJ, Mckeen C, et al. Duplex scorpion primers in SNP analysis and FRET applications[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(20):E96.

(收稿日期:2014-08-19 修回日期:2014-10-05)

(上接第 323 页)

学杂志,2011,21(5):1034-1036.

- [6] Tascini C, Gemignani G, Doria R, et al. Linezolid treatment for gram-positive infections; a retrospective comparison with teicoplanin[J]. J Chemother, 2009, 21(3):311-316.
- [7] 汪复,张婴元. 实用抗感染治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:297-299.
- [8] Lin DF, Zhang YY, Wu JF, et al. Linezolid for the treatment of infections caused by Gram-positive pathogens in China[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(3):241-249.
- [9] Shang W, Yang YQ, Wang XM, et al. Distribution of coagulase-negative staphylococci from trauma patients and

its drug resistance[J]. Chin J Nosocomiol, 2011, 21(5):1030-1033.

- [10] Kocher S, Müller W, Resch B. Linezolid treatment of nosocomial bacterial infection with multiresistant Gram-positive pathogens in preterm infants: a systematic review[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36(2):106-110.
- [11] 王晓蕾,孙海滨,陈桃英,等. 利奈唑胺治疗新生儿耐药革兰氏阳性球菌败血症临床分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(2):213-214.

(收稿日期:2014-07-07 修回日期:2014-10-15)