

驼乳中布鲁氏菌实时荧光 PCR 快速检测方法的建立

张 杰¹, 赵国玉², 艾依热提·买买提², 陈欣乐², 木合塔尔·艾山², 杨洪彩^{2*}

(1. 新疆医科大学公共卫生学院, 乌鲁木齐 830001; 2. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 建立驼乳中布鲁氏菌的实时荧光 PCR 快速检测方法。**方法** 根据布鲁氏菌外膜蛋白 *omp10* 基因的碱基序列, 设计引物探针, 从模拟布鲁氏菌污染的驼乳中提取布鲁氏菌 DNA 片段进行实时荧光 PCR 扩增检测。**结果** 该方法从布鲁氏菌 M5 株中扩增出了特异性目的片段 *omp10*, 而对大肠埃希氏杆菌等细菌的扩增结果均为阴性。经过 10 倍比稀释的模板进行检测, 该方法的灵敏度为最低可检出 2.31×10^{-4} ng/ μ L 的 DNA。标准曲线循环阈值与模板浓度呈良好线性关系, 相关系数为 0.9928, 扩增效率 $E=0.97$ 。**结论** 建立的实时荧光 PCR 检测方法具有特异性强、灵敏度高的优点, 为驼乳中布鲁氏菌病的早期预防及流行病学监测提供了有效的技术手段。

关键词: 驼乳; 布鲁氏菌; 实时荧光 PCR

Establishment of a real-time fluorescent PCR assay for rapid detection of *Brucella* in camel milk

ZHANG Jie¹, ZHAO Guo-Yu², AYIGETTI Mai-Ma-Ti²,
CHEN Xin-Le², MUHTAR Ai-Shan², YANG Hong-Cai^{2*}

(1. Public Health Institute of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, China; 2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Center for Disease Prevention and Control, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid detection method for *Brucella* in camel milk by real-time fluorescent PCR method. **Methods** According to the base sequence of the *Brucella* outer membrane protein *omp10* gene, a primer probe was designed to extract the *Brucella* DNA fragment from camel milk simulating *Brucella* contamination for real-time fluorescent PCR amplification detection. **Results** The specific target fragment *omp10* was amplified from *Brucella* M5, but the amplification results for bacteria such as *Escherichia coli* were negative. This method had a minimum sensitivity of 2.31×10^{-4} ng/ μ L DNA when tested with a template diluted 10-fold. The circulation threshold of the standard curve showed a good linear relationship with the template concentration, with the correlation coefficient of 0.9928 and amplification efficiency $E=0.97$. **Conclusion** The established real-time PCR detection method has the advantages of strong specificity and high sensitivity, and provides an effective technical means for early prevention and epidemiological monitoring of brucellosis in camel milk.

KEY WORDS: camel milk; *Brucella*; real-time fluorescence PCR

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2018D01C085)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2018D01C085)

***通信作者:** 杨洪彩, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为消毒与感染控制。E-mail: hcyang66@163.com

***Corresponding author:** YANG Hong-Cai, Master, Professor, Xinjiang Uygur Autonomous Region Center for Disease Prevention and Control, No.380, Jianquan Road, Urumqi 830011, China. E-mail: hcyang66@163.com

0 引言

布鲁菌病(Brucellosis)是由布鲁氏菌(*Brucella*)引起的以发热和流产为主要特征的人畜共患传染病,该病广泛分布于世界各地^[1-3]。近年来,布鲁菌病频频发生,直接威胁到了人和动物的健康,造成了巨大的经济损失和严重的公共卫生危害^[4-6]。布鲁菌病防控的关键是对病原尽早进行快速、准确的检测并确诊。目前,用于乳品中布鲁菌的检测方法可分为 3 类,第一类是直接对乳样中的布鲁菌进行分离培养,虽然是布鲁菌检测的金标准,但病原菌的分离技术要求复杂、耗时长、检出率低,特别是存在生物安全风险^[7];第二类是血清学检测方法,包括平板凝集试验、试管凝集试验、补体结合试验及酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等^[8-12]。该方法虽然较为简便,但存在特异性不强、敏感性差等缺点,易出现假阴性或假阳性结果;第三类是分子生物学检测技术,随着分子生物学技术的发展,PCR 方法以其灵敏、高效、省时省力、安全可靠等优点已被广泛应用于布鲁菌鉴定^[13-15]。

随着各类乳制品进入千家万户,乳与乳制品的安全受到前所未有的关注,新疆、内蒙的驼乳产业较发达,2017 年以来新疆、内蒙相继颁布并实施了《生驼乳》等十项食品安全地方标准。布鲁菌病成为社会各界共同关注的热点,布鲁菌病原菌分离的条件要求苛刻,用常规方法进行病原诊断不但效率低,而且容易受污染,生物危害性也较大^[16]。目前,羊乳和牛乳中布鲁氏菌 PCR 检测方法研究较多,苏娇等^[17]用 BCSP31 作为布鲁氏菌属特异性基因,设计特异性引物和 Taqman 探针检测牛、羊乳中布鲁氏菌;王晶钰等^[18]采用布鲁氏菌中特异性基因 *omp31* 和 *bp26* 作为检测靶基因,建立了牛乳中布鲁氏菌 PCR 检测方法,但驼乳中布鲁氏菌的检测方法未见报道。本研究在羊、牛乳中布鲁氏菌 PCR 快速检测方法的基础上,建立驼乳中布鲁氏菌的 PCR 快速检测方法,为驼乳中布鲁氏菌病的早期预防及流行病学监测提供有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 供试样品

被检样品来自新疆某驼乳场。

1.2 仪器与试剂

LightCycler96 实时荧光 PCR(美国罗氏公司); Nanodrop 2000 超微量分光光度计(美国 Thermo 公司); 3K15 型低温高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司)。

布鲁菌疫苗株 M5 (*Brucella* sp., ATCC 25840)、大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*, ATCC25922)、溶血性链球菌(*Streptococcus*, CMCC32210)、克雷伯氏杆菌(*Klebsiella* Trevisan, CMCC46117)、金黄色葡萄球菌[*Staphylococcus aureus*, CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌 [*Pseudomonas aeruginosa*, CMCC(B)10104](中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(日本 Taraka 公司)。

引物和探针序列由生工生物科技有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 的提取

将布鲁氏菌 M5、大肠埃希氏杆菌、溶血性链球菌、克雷伯氏杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 1.0 mL 分别接种于 100 mL 适宜的液体培养基中,37 °C,培养 16 h 增菌。再分别将培养液摇匀后取 0.5 mL 放入 1.5 mL 离心管中,加入 1.0 mL 灭菌生鲜驼乳充分混匀,12000 r/min,离心 5 min,弃去上清后按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作,同法提取提布鲁氏菌 M5 DNA,提取的 DNA 于-20 °C保存备用。

1.3.2 布鲁菌荧光定量 PCR 引物和探针的设计与合成

根据布鲁氏菌外膜蛋白 *omp10* 基因的碱基序列,运用 Primer 5.0 软件设计引物及其探针见表 1。

1.3.3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光定量 PCR 反应体系(总体积 20.0 μL): 2×real-time Mix10.0 μL, dd H₂O 6.8 μL, 上下游引物和探针(0.1 nmol/mL)各 0.4 μL, 模板 DNA 2.0 μL。

1.3.4 实时荧光 PCR 反应条件

布鲁氏菌实时荧光定量 PCR 的反应条件: 93 °C预变性 2 min; 40 个循环为 93 °C变性 15 s, 60 °C退火/延伸 1 min。

1.3.5 实时荧光 PCR 的质量控制及结果判定

空白及阴性质控品扩增曲线无明显对数增长期且 Ct 值大于 27; 阳性质控品扩增曲线有明显对数增长期且 Ct 值小于等于 22。实时荧光定量 PCR 结果判定: 若扩增曲线无明显对数增长期或 Ct 值大于 27, 则判样品为布鲁氏菌病阴性; 若扩增曲线有明显对数增长期且 Ct 值小于等于 27, 则判样品为布鲁氏菌阳性。

表 1 引物和探针序列
Table 1 Primer and probe sequences

扩增片段	序列	目的基因
上游引物	5'-TGGCTGCTTGCGAAACAAC-3'	外膜蛋白 <i>omp10</i> 基因
下游引物	5'-ATTGAGGAAGCGATGCCGT-3'	
探针	FAM-AATGCCCGCATCATAGCCCATACC-BHQ1	

1.3.6 布鲁氏菌实时荧光 PCR 方法特异性检测

以布鲁氏菌 DNA 为阳性对照, 布鲁氏菌污染驼乳提取 DNA 为样品, 分别以大肠埃希氏杆菌、溶血性链球菌、克雷伯氏杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌污染驼乳提取的 DNA 为阴性对照, dd H₂O 为空白对照。根据上述建立的驼乳中布鲁氏菌实时荧光定量 PCR 检测方法, 进行扩增检测, 进一步确定建立的布鲁氏菌实时荧光 PCR 检测方法的特异性。

1.3.7 布鲁氏菌实时荧光 PCR 方法灵敏度检测

用超微量紫外分光光度计测量布鲁氏菌 DNA 浓度及纯度, 然后进行 10 倍梯度系列稀释, 再用所建立的实时荧光 PCR 方法进行扩增测定, 根据荧光值的大小检测其方法灵敏度。

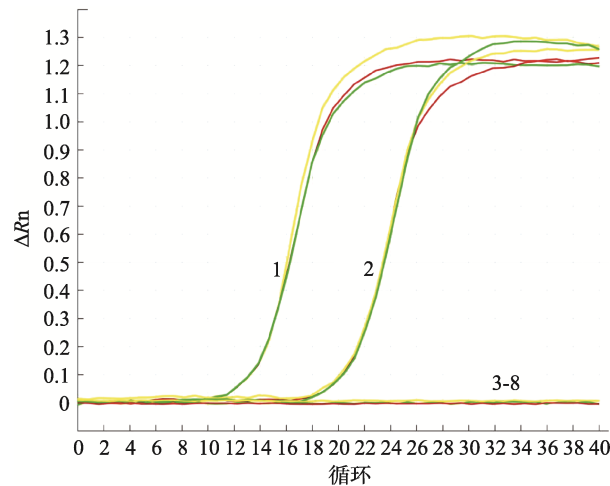
1.3.8 标准曲线的构建

将定量后的布鲁氏菌 DNA 浓度按 10 倍梯度稀释, 按 1.3.4 方法进行扩增, 每个浓度重复 3 次, 作为标准品。选择荧光值稳定、线性比例良好的浓度范围, 以 DNA 浓度对数值为 X 轴、Ct 值为 Y 值, 建立标准曲线。根据 PCR 标准曲线的斜率、相关系数、扩增效率 *E* 等, 验证该方法的有效性。其中标准曲线斜率为-3.0~-3.5、*r*² > 0.98、PCR 扩增效率 *E* 为 0.9~1.2。

2 结果与分析

2.1 布鲁氏菌实时荧光 PCR 方法特异性检测

实验结果显示, 大肠埃希氏杆菌、溶血性链球菌、克雷伯氏杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌污染驼乳提取的 DNA 经扩增, 均为阴性结果; 只有布鲁氏菌阳性对照和布鲁氏菌污染的乳液样本有明显扩增曲线, 且 Ct < 22。结果见图 1。

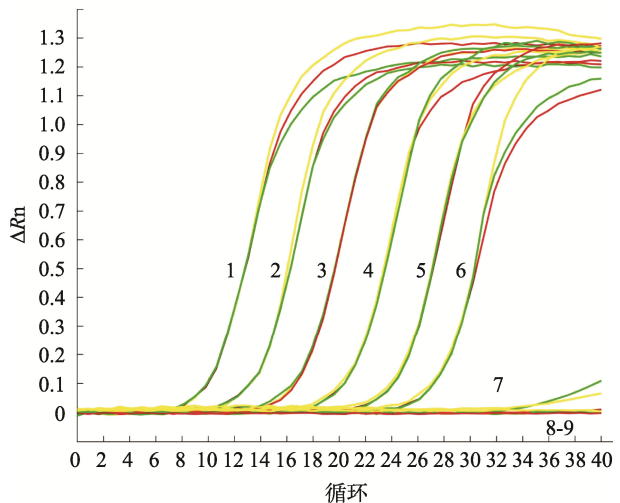


注: 1: 布鲁氏菌阳性对照; 2: 模拟样本(布鲁氏菌污染驼乳); 3~7: 阴性对照(分别为大肠埃希氏杆菌、溶血性链球菌、克雷伯氏杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌污染驼乳); 8: 空白对照(dd H₂O)。

图 1 布鲁氏菌实时荧光 PCR 方法特异性
Fig.1 Specificity of real-time fluorescent PCR method for *Brucella*

2.2 布鲁氏菌实时荧光 PCR 方法灵敏度检测

通过超微量紫外分光光度计测量布鲁氏菌 DNA A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.87, 说明纯度较好, DNA 浓度为 23.1 ng/μL, 将初始模板 DNA 浓度按 10 倍梯度进行稀释, 以不同稀释 DNA 作模板, 分别进行 PCR 扩增, 结果表明: PCR 灵敏度为 2.31×10⁻⁴ ng/μL。结果见图 2。



注: 1~8: 布鲁氏菌 DNA 浓度分别为 23.1~2.31×10⁻⁶ ng/μL; 9: 空白对照。

图 2 布鲁氏菌实时荧光定量 PCR 方法灵敏度
Fig.2 Sensitivity of real-time fluorescent quantitative PCR method for *Brucella*

2.3 标准曲线的构建

将初始模板布鲁氏菌 DNA (23.1 ng/μL)按 10 倍浓度进行梯度稀释后进行实时荧光 PCR 测定, 绘制标准曲线。结果显示: 直线回归方程为 Y=-3.4045X+29.856, 相关系数 *r*²=0.9928, 标准曲线斜率为-3.4045, PCR 扩增效率 *E*=0.97, 模板 DNA 浓度与 Ct 值之间呈良好的线性关系。

3 结论与讨论

随着近年来科技和经济的飞速发展, 实时荧光 PCR 仪等设备逐渐普及到基层检测单位, 使得实时荧光定量 PCR 检测乳样中布鲁菌病受到关注。实时荧光 PCR 是在常规 PCR 基础上, 在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 具有特异性强、灵敏度高、操作安全、仪器在线实时检测、结果客观等优点。本研究根据布鲁氏菌外膜蛋白保守基因 *omp10* 设计引物、合成探针, 并建立荧光定量分析体系。结果显示, 本研究建立的检测体系准确性高, 且表现出较高的检测特异性和灵敏度。由于该方法在测定前可以通过高温巴氏灭菌法对待检测乳样进行灭活处理, 在实际操作中减少了与布鲁氏菌接触的几率, 降低了生物安全风险, 因此该方法具有较

高的实际应用价值。

在布鲁氏菌实时荧光 PCR 检测中,可选取其外膜蛋白基因作为检测的靶基因,其中编码布鲁氏菌外膜蛋白 *omp10* 是布鲁氏菌重要的免疫原性蛋白,保守性较强,存在于所有已知布鲁氏菌的生物型之中^[19-20]。因此可以提高布鲁氏菌检测的准确性。

通过特异性检测结果说明,该方法只对布鲁氏菌具有较高的特异性,而对大肠埃希氏杆菌、溶血性链球菌、克雷伯氏杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌无特异性。灵敏度试验结果表明,本研究所建立的实时荧光 PCR 方法能够检测到布鲁氏菌基因组 DNA 最低为 2.31×10^{-4} ng/ μ L,说明该方法具有较高的灵敏度。通过 PCR 反应标准曲线也可看出模板 DNA 量越多,荧光达到阈值的循环数越少,即 Ct 值越小。此外,本研究所建立的实时荧光 PCR 检测特异性强、敏感性高,且实时荧光定量 PCR 检测方法无需通过电泳检测,不使用溴化己锭等对人致癌的染料,不污染环境,一般只需 2 h 便可完成检测过程。因此,实时荧光 PCR 是一种检测驼乳中布鲁氏菌既简便可靠又快速安全的方法,可以为布鲁氏菌病的早期诊断及流行病学调查提供有力技术支持。

参考文献

- [1] 马淑强, 杨世英, 马伟林, 等. 布鲁氏病毒研究进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2014, 35(2): 57-64.
- [2] 王晓花, 廉颖, 汪明明, 等. 布鲁氏菌 218 例临床特征分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(10): 928-931.
- [3] MARYAM D, YOUCEF SI, YADOLAH F, *et al.* The global epidemiology of *Brucella* infections in terrestrial wildlife: A meta-analysis [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 7(17): 1674-1692.
- [4] SHI F, SUN Y, WU Y, *et al.* A novel, rapid and simple method for detecting brucellosis based on rapid vertical flow technology [J]. *J Appl Microbiol*, 2019, 11(12): 794-802.
- [5] 郑世野. 布鲁氏病毒流行情况及危害调查分析[J]. 中国医药指南, 2020, 18(17): 186-187.
- [6] 刘青华, 胡春岭, 张颖, 等. 布鲁氏菌 44 例临床特征分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2019, 19(5): 495-498.
- [7] CHE LH, QI C, BAO WG, *et al.* Monitoring the course of *Brucella* infection with qPCR-based detection [J]. *Int J Infect Dis*, 2019, 89: 66-71.
- [8] 王璟, 代蕾, 章瑶, 等. 动物布鲁氏菌病诊断方法[J]. 动物医学进展, 2019, 40(12): 114-117.
- [9] 姬智. 布鲁氏菌病几种血清学检测方法的比较与分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- [10] 李宗瑾, 郭晏强, 李艳艳, 等. 虎红平板凝集试验、试管凝集试验及酶联免疫吸附试验等布鲁氏菌病检测方法比较和 ROC 曲线分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(9): 1069-1071.
- [11] 田路路, 李会玲, 支飞杰, 等. 布鲁氏菌 OMP16 抗体的间接 ELISA 方法建立[J]. 动物医学进展, 2021, 42(3): 30-35.
- [12] 尉瑞平, 王美霞, 宋利桃, 等. 布鲁氏菌病 3 中检测方法的比较分析[J]. 医学动物防制, 2019, 7(35): 711-713.
- [13] CHETNA G, GURURAJ K, ANIL KM, *et al.* Molecular detection of important abortion-causing microorganisms in preputial swab of breeding bucks using PCR-based assays [J]. *Reprod Domest Anim*, 2020, 8(13): 1520-1525.
- [14] 刘志国, 崔步云, 刘日宏, 等. 布鲁氏菌分子分型方法应用研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(2): 163-168.
- [15] 苏娇. 鉴别牛羊布鲁氏菌荧光定量 PCR 方法的建立[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.
- [16] KEID LB, SOARES RM, VASCONCELLOS SA, *et al.* Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis [J]. *Res Vet Sci*, 2009, 86: 22-26.
- [17] SU J, WANG YJ, ZHI DF, *et al.* Establishment of real-time fluorescence quantitative PCR to identify *B. abortus* and *B. melitensis* [J]. *Anim Husb Feed Sci*, 2013, 34(5): 7-12.
- [18] LI Z. Comparison and analysis of several serological detection methods for brucellosis [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [19] LI ZJ, GUO YQ, LI YY, *et al.* Comparison and analysis of serological tests including RBT, SAT and ELISA by ROC curve in brucellosis [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2020, 30(9): 1069-1071.
- [20] TIAN LL, LI HL, ZHI FJ, *et al.* Study on indirect ELISA of OMP16 antibodies in *Brucella* [J]. *Progress Vet Med*, 2021, 42(3): 30-35.

- [18] 王晶钰, 张三东, 刘红彦, 等. 布鲁菌病多重 PCR 快速检测方法的建立及应用[J]. 动物医学进展, 2010, 31(S): 5-9.

WANG JY, ZHANG SD, LIU HY, *et al.* Establishment and application of multiplex-PCR for rapid detection of brucellosis [J]. Progress Vet Med, 2010, 31(S): 5-9.

- [19] GUPTA VK, VERMA DK, SINGH SV, *et al.* Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane [J]. Small Ruminant Res, 2007, 70: 260-266.

- [20] CHEN Y, MING LI. Cloning, prokaryotic expression and identification of gene encoding *Brucella* outer membrane protein *OMP10* and the *bp26* gene [J]. Chin J Zoonoses, 2006, 22(4): 313-317.

(责任编辑: 张晓寒 王欣)

作者简介



张 杰, 博士, 高级实验师, 主要研究方向为环境与健康研究。

E-mail: zhangjie3068@sohu.com



杨洪彩, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为消毒与感染控制。

E-mail: hcyang66@163.com