

实验动物常见支原体荧光定量 PCR 检测方法建立

辛闻婷 杨媛媛 王馨宇 吴 东 李灵恩

(江苏集萃药康生物科技有限公司, 南京 210061)

摘要:目的 建立能对实验动物常见支原体进行检测的荧光定量 PCR 方法。方法 针对多种大、小鼠易感支原体的 16 s rRNA 基因中较保守的区域设计 1 对引物和探针,建立荧光定量 PCR 方法并检测其特异性、灵敏性及重复性。结果 该方法在模板浓度为 $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^6$ copies/ μL 之间呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.9972$) 且扩增效率为 98.11%;特异性强,能够区分检测金黄色葡萄球菌等常见的病原菌;灵敏性高,检测下限为 5 copies/ μL ,比常规 PCR 的检测灵敏性高 100 倍;重复性好,对不同浓度模板进行组内和组间重复性试验的变异系数均低于 2%。用荧光定量 PCR 和普通 PCR 方法对不同来源不同类型的 120 份临床样品进行检测,结果表明小鼠支原体检测阳性率分别为 3.33% (2/60)、1.67% (1/60),细胞样品支原体检测阳性率均为 5% (3/60)。结论 本研究建立的荧光定量 PCR 方法快速、特异强、灵敏性高、重复性好,可用于实验动物常见支原体的快速诊断。

关键词:支原体;实验动物;荧光定量 PCR

中图分类号: R-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)05-0060-06

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.05.011

支原体 (*Mycoplasma*) 属于柔膜体纲 (Mollicutes),支原体目 (Mycoplasmatales),支原体科 (Mycoplasmataceae),是能够在无生命培养基上生长的最小微生物^[1]。迄今为止,很多研究表明支原体对实验动物和细胞有不同程度的污染^[2-6],给科研、教学、生产领域相关的实验结果造成了很大的影响。

目前针对支原体的检测方法有多种^[7-8],主要有病原分离鉴定法、血清学检测方法(间接免疫荧光法、酶联免疫吸附试验、免疫组化方法、间接血凝试验等)和分子生物学检测方法(PCR、荧光定量 PCR、环介导等温扩增技术等)。其中,病原分离鉴定方法所需周期较长(2~3 周)、技术要求高;而免疫学方法容易和其它病原发生交叉反应,特异性和敏感性较差;因此分子生物学方法是实验室检测支原体的首选方法。

本研究建立了支原体荧光定量 PCR 检测方法,具有快速、特异、灵敏、可大批量检测的特点,并可根据测序结果判断支原体类型,为实验室多种常见支原体的快速诊断提供了依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和样品

肺炎支原体 (*Mycoplasma pulmonis*) 与猪鼻支原体 (*Mycoplasma hyorhinis*) 为实验室分离保存。小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*) CMCC (B) 52204、假结核耶尔森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) CMCC 53504、沙门氏菌 (*Salmonella*) ATCC 14028、肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) CMCC (B) 46117、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538 购自环凯微生物科技有限公司,嗜肺巴斯德杆菌 (*Pasteurella pneumotropica*) ATCC 35149、鼠棒状杆菌 (*Corynebacterium kutscheri*) ATCC 15677 购买自美国菌种保藏中心 (ATCC)。

不同来源的 60 份小鼠肺脏、60 份细胞培养物经冷链运输至本单位后冻存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.2 主要试剂与仪器

AceQ U⁺ Probe Master Mix 购自南京诺唯赞生

收稿日期:2019-03-11

作者简介:辛闻婷(1990—),女,生物学硕士,研究方向:实验动物检测。E-mail: xinwt@gempharmatech.com

通信作者:李灵恩(1984—),女,临床兽医硕士,中级实验师,研究方向:实验动物管理。E-mail: lile@gempharmatech.com

物科技有限公司;蛋白酶 K 购自上海鼓臣生物技术有限公司;EDTA 与 Tris-HCl 购自 BIOSHARP 公司。

Roche LightCycler 96 购自罗氏诊断产品(上海)有限公司;柏恒 GE9612T 智能梯度 PCR 仪器购自杭州柏恒科技有限公司;天能 EPS300 电泳仪及电泳槽购自上海天能科技有限公司;Quawell Q5000 超微量紫外分光光度计购自美国 QUAWELL 科技公司。

1.3 引物设计与合成

通过比对 Genbank 上多种大、小鼠易感支原体的 16 s rRNA 基因中较保守的区域,用 Primer Express 3.0 设计引物和探针序列,再使用 Primer 5 与 Oligo 7 软件排除引物二聚体及错配后,最终确定引物(Myco FP、Myco RP)与探针(Myco P)的序列,预计扩增目的片段大小为 168 bp。引物和探针的序列见表 1,由北京擎科新业生物科技有限公司合成。

表 1 引物和探针序列
Table 1 The sequence of primers and probe

引物或探针的名称	引物或探针的序列	目的片段长度/bp
M13 F	5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3'	278
M13 R	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'	
Myco FP	5'-ATGGAGTGACACAGCGTGCA-3'	168
Myco RP	5'-GGATAACGCTTGCRACCTATGTAT-3'	
Myco P	5'-FAM-CCGCGGCTGCTGGCACATAGTT-BHQ-3'	

1.6 标准曲线的绘制

用超微量紫外分光光度计测量质粒标准品的浓度,根据公式:待测质粒拷贝数(copies/ μL)= $(6.02\times10^{23}\times\text{样品浓度}(\text{ng}/\mu\text{L})\times10^{-9})/(\text{模板长度}\times660)$,计算质粒标准品的拷贝浓度。以 10 倍倍比稀释至 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、 5×10^0 copies/ μL 的质粒标准品为阳性模板,超纯水为阴性对照,用已优化好的程序进行荧光定量 PCR 扩增,绘制标准曲线。

1.7 荧光定量 PCR 敏感性检测

以 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、 5×10^0 copies/ μL 6 个浓度梯度的质粒标准品为阳性模板,超纯水为阴性对照,分别进行荧光定量 PCR 和普通 PCR 检测,比较两种检测方法的灵敏性。

1.8 荧光定量 PCR 特异性检测

用支原体荧光定量 PCR 方法对肺支原体、猪鼻支原体、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德杆菌、金黄色

1.4 质粒标准品的构建

将目的片段的序列交由北京擎科新业生物科技有限公司合成含目的片段的质粒标准品 pUC57-myco。使用载体 pUC57 的通用测序引物 M13 F、M13 R 对得到的质粒标准品进行 PCR 扩增,送由北京擎科新业生物科技有限公司测序。

1.5 荧光定量 PCR 反应体系及条件的优化

以质粒标准品为模板,根据荧光定量 PCR 试剂盒说明书配置 10 μL 反应体系:2 $\times$ AceQ U⁺ mix 5 μL , Myco FP 1 μL , Myco RP 1 μL , Myco P 1 μL , 模板 1 μL , 超纯水补至 10 μL 。采用上述的反应体系,将引物和探针的浓度分别配制成 250、350、450、550 nmol/L,每个引物和探针浓度的组合做两个重复,利用矩阵法对引物浓度和探针浓度进行优化。

用确定的引物、探针浓度及反应体系,将退火温度设置为 58~65 $^{\circ}\text{C}$ 之间的 8 个随机温度梯度,每个温度梯度做两个重复,以优化退火温度。

葡萄球菌、绿脓杆菌、鼠棒状杆菌进行检测。若产生扩增曲线,对其进行测序。

1.9 荧光定量 PCR 重复性检测

以 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 copies/ μL 4 个浓度梯度的质粒标准品为模板进行组内和组间重复性实验。组内重复性实验为每个浓度梯度的模板设置 4 个重复;组间重复性实验为每个浓度梯度的模板独立进行 4 次。将检测结果进行统计学分析,以评价本支原体荧光定量 PCR 的重复性。

1.10 临床样品检测

1.10.1 样品处理

肺脏样品处理:剪取针尖大小的小鼠肺脏组织,放入灭菌后的 1.5 mL Eppendorf 管,加入 500 μL 含有蛋白酶 K 的消化液,在 56 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中消化过夜。次日早晨将消化液 12 000 r/min 离心 10 min 后,取 300 μL 上清加入 300 μL 异丙醇,上下颠倒几次后 12 000 r/min 离心 10 min,弃去管内液体充分晾干后,加 100 μL 超纯水后即得样品 DNA。

细胞样品处理：吸取细胞及培养液 1 mL 至 Eppendorf 管内,12 000 r/min 5 min 离心以收集底部细胞。弃上清后加入 200 μL 超纯水吹打细胞,用恒温混匀仪 37 ℃ 孵育 1 h 后 95 ℃ 300 r/min 振摇使细胞裂解,即得基因组 DNA。

1.10.2 临床样品检测:使用本研究建立的支原体荧光定量 PCR 方法和普通 PCR 方法对 120 个临床样品 DNA 进行检测,并比较两种方法的检出率。若产生扩增曲线,对其进行测序。

2 结果

2.1 质粒标准品的鉴定

对质粒标准品进行 PCR 扩增后,将扩增产物送测序,NCBI 上进行序列比对。结果显示,目的片段与支原体属中多种支原体的基因同源性达 98%,表明标准品质粒构建成功。

2.2 荧光定量 PCR 反应条件的优化

通过矩阵法优化引物与探针的最佳浓度组合发现,当上、下游引物均为 450 nmol/L,探针为 250 nmol/L 时,扩增效率最佳。同时优化退火温度,确定荧光定量 PCR 反应程序如下(其中包含降落 PCR 程序以增强特异性):95 ℃ 2 min;前 10 个循环降落 PCR:95 ℃ 10 s,65~60 ℃ 30 s(每循环下降 0.5 度),72 ℃ 30 s;后 30 个循环普通 PCR:95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s;最后 37 ℃ 孵育 30 s。

2.3 荧光定量 PCR 的标准曲线

使用超微量紫外分光光度计测得质粒标准品浓度为 158.97 ng/μL,根据 1.6 中公式计算可得质粒标准品的拷贝浓度为 5×10^{10} copies/μL。将质粒标准品 10 倍倍比稀释至 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、 5×10^0 copies/μL。用已优化好的体系及程序进行荧光定量 PCR,绘制的标准曲线如图 1 所示。标准曲线公式为 $y = -3.3679x + 38.24$,扩增效率 $E = 98.11\%$,相关系数 $R^2 = 0.9972$,表明该荧光定量 PCR 方法在 $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^6$ copies/μL 之间能进行高效扩增且有很好的线性关系。

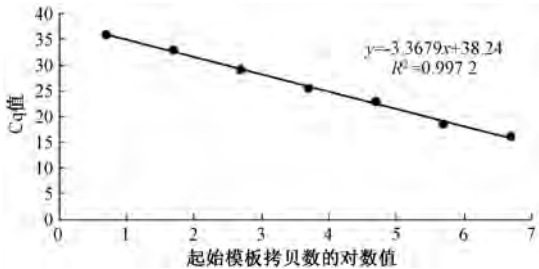


图 1 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.1 The standard curve of the real-time PCR

2.4 荧光定量 PCR 的灵敏性

用荧光定量 PCR 方法和普通 PCR 方法对不同浓度的质粒标准品进行检测。结果显示,荧光定量 PCR 方法能够检出质粒标准品的最低浓度为 5 copies/μL(图 2),PCR 方法能够检出质粒标准品的最低浓度为 5×10^2 copies/μL(图 3),表明本研究建立的支原体荧光定量 PCR 的检测灵敏性是常规 PCR 方法的 100 倍。

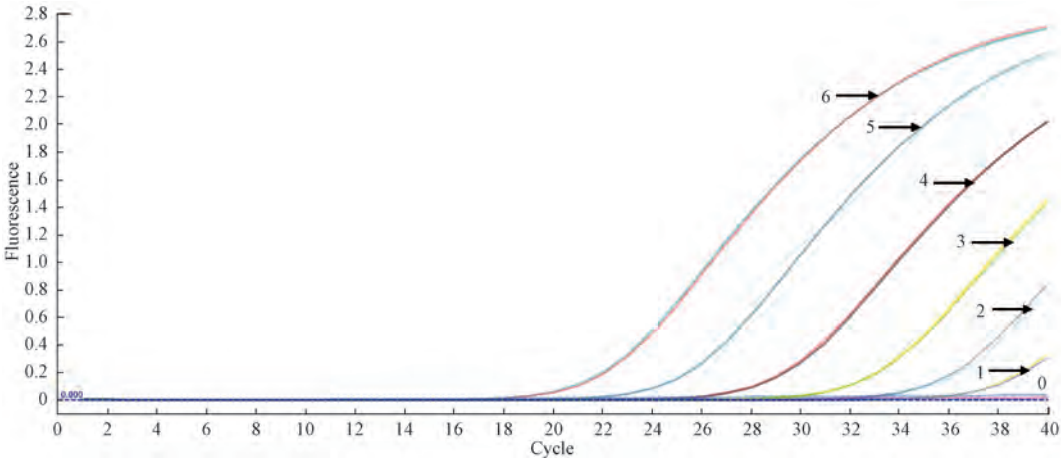


图 2 荧光定量 PCR 灵敏性检测

注:6~1:质粒标准品的浓度分别为 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、 5×10^0 copies/μL;0:阴性对照

Fig.2 Sensitivity test of the real-time PCR

Note: 6~1: The concentration of standard plasmid was 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、 5×10^0 copies/μL, respectively; 0: negative

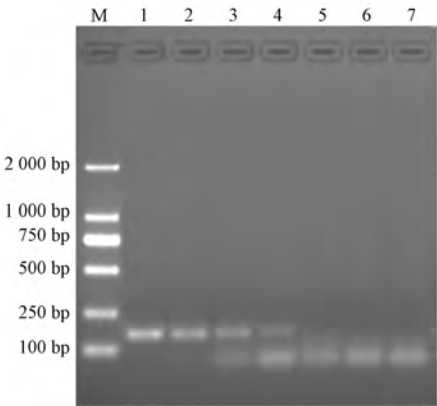


图 3 普通 PCR 灵敏性检测

注:M:DL 2000 DNA Marker;1~6:质粒标准品的浓度分别为 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、 5×10^0 copies/ μ L;7:阴性对照

Fig.3 Sensitivity test of the conventional PCR

Note: M: DL 2000 DNA Marker; 1~6: The concentration of standard plasmid was 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、 5×10^0 copies/ μ L, respectively; 7: negative control

2.5 荧光定量 PCR 的特异性

用该荧光定量 PCR 方法对多种常见病原进行检测。结果如图 4 所示,肺支原体与猪鼻支原体有扩增曲线,且测序结果均为支原体。而其他病原菌:

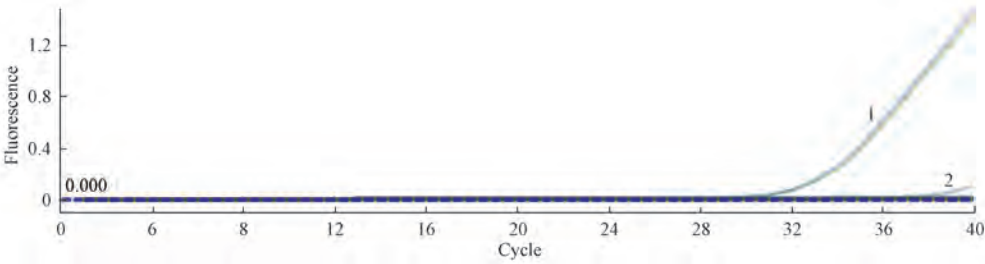


图 4 荧光定量 PCR 特异性检测

注:1:肺支原体与猪鼻支原体;2:其他参与检测的病原菌与阴性对照

Fig.4 Specific test of the real-time PCR

Note: 1: *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma hyorhinis*; 2: the other pathogenic strains participated in this test and negative control

表 2 荧光定量 PCR 重复性试验结果

Table 2 Reproducibility test results of the real-time PCR

质粒标准品浓度/ (copies/ μ L)	组内重复试验		组间重复试验	
	Cq 平均值	变异系数/%	Cq 平均值	变异系数/%
5×10^5	18.528 $\pm$ 0.082	0.442	18.345 $\pm$ 0.354	1.929
5×10^4	23.063 $\pm$ 0.113	0.490	22.939 $\pm$ 0.141	0.616
5×10^3	25.673 $\pm$ 0.048	0.187	25.437 $\pm$ 0.323	1.269
5×10^2	29.108 $\pm$ 0.116	0.399	28.891 $\pm$ 0.179	0.621



3 讨论

大、小鼠是最常用的实验动物之一,有资料表明实验用大、小鼠广泛存在支原体感染^[2-3],常见的有肺支原体 (*M. pulmonis*)、关节炎支原体 (*M. arthritidis*)、溶神经支原体 (*M. neurolyticum*) 等。其中,肺支原体是对实验动物危害最大的一种支原体。肺支原体在大、小鼠中多呈隐性感染,导致动物的繁殖能力降低;在受到应激或免疫系统受到抑制时发病,并表现为咳嗽、肺炎等症状^[9]。尽管支原体感染后多无明显的临床症状,但是病原的存在会对免疫学、老年病学、营养学、行为学等实验造成一定干扰^[10]。

目前国内外常用的支原体检测方法为病原培养法、免疫学方法和分子生物学方法,每种方法各有利弊^[7-8,11-12]。其中,分子生物学方法以其快速、灵敏、特异性强等优点吸引了越来越多的关注。常用的分子生物学检测方法主要是常规 PCR 和荧光定量 PCR,但荧光定量 PCR 的灵敏性远高于常规 PCR,且具有快速和高通量的优势,适合对大批量样品进行快速定量检测。武昱孜等^[13]用常规 PCR、套式 PCR 以及荧光定量 PCR 方法检测同一批样品,结果显示检出率分别为 18.0 %、53.9 % 和 55.1 %。何曼莉等^[14]研究显示,实时荧光定量 PCR 具有快速、准确和易标准化等优点,能够代替颜色变化单位 (color change unit, CCU) 法和浊度法对绵羊支原体进行定量。

本研究针对多种大、小鼠易感支原体的 16 s rRNA 基因中较保守的区域设计引物和探针,建立了支原体荧光定量 PCR 检测方法。该荧光定量 PCR 方法的标准曲线相关系数 $R^2 = 0.9972$,扩增效率 $E = 98.11\%$,具有良好的线性关系,且当模板浓度在 $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^6$ copies/ μL 之间时能进行高效扩增。该方法特异性强,与小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、鼠棒状杆菌无交叉反应;灵敏性高,最低检测限为 5 copies/ μL ,灵敏性较常规 PCR 方法高 100 倍,同时还能通过测序鉴定支原体亚型;稳定性好,组内和组间重复性试验的变异系数均低于 2%。用该方法进行小鼠和细胞两种样品的临床检测,结果证实了该方法可用于小鼠的临床样品检测,同时检测结果与已报道的支原体

流行率相符^[2]。

另外,值得关注的是,该方法也可用于细胞易感支原体的检测。细胞对于各种生物制品、科研实验来说是必不可少的实验材料之一。自从 Robinson 等在 1956 年从一株 Hela 细胞培养液中分离出支原体以来,国内外有关支原体污染细胞的报道屡见不鲜。目前已报道的能够污染细胞的支原体有二十多种,常见的有发酵支原体 (*M. fermentans*)、猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、精氨酸支原体 (*M. arginina*)、人型支原体 (*M. hominis*) 等^[15-17]。支原体感染后的细胞往往生长状态不佳^[18],且细胞的 DNA、RNA 和蛋白的表达可能发生变化^[19],降低实验结果的准确性。本研究建立的支原体荧光定量 PCR 检测方法能够同时检测实验动物及细胞易感支原体,提升了其应用价值。

综上所述,本研究成功建立了实验室多种常见支原体的荧光定量 PCR 检测方法,具有高特异性、高灵敏性、高稳定性、高通量及快速准确等优势,为实验动物常见支原体的快速检测提供了方法。

参考文献

- [1] 邵国青. 我国主要动物支原体病研究述略与展望[J]. 畜牧与兽医, 2000, 32(2): 37-8.
- [2] 巩薇, 罗建辉, 王春玲, 等. 小鼠肺支原体抗体 ELISA 检测法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2002, 12(3): 163-165.
- [3] 王保宁, 宁磊. 兰州地区实验动物肺支原体感染调查和分离鉴定[J]. 中国实验动物学报, 2001, 9(4): 239-241.
- [4] 周翠堤, 嵇本秀, 陈培龙. 上海地区大、小鼠中霉形体的分离和血清学鉴定[J]. 实验动物与比较医学, 1989, (3): 129-133.
- [5] Kong F, James G, Gordon S, et al. Species-specific PCR for identification of common contaminant mollicutes in cell culture [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(7): 3195-3200..
- [6] 刘江, 姜述德. 细胞培养中支原体污染的 PCR 检测[J]. 中国细胞生物学学报, 1996, (3): 134-139.
- [7] 张莉, 魏润生, 康新华, 等. 家畜常见支原体检测方法的研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2017, 36(5): 31-33.
- [8] 陈倩, 王会中, 郭燕菊, 等. 肺炎支原体实验室检测方法研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(16): 3181-3183.
- [9] 许有才, 赵世元. IL-3 在肺炎支原体感染小鼠体内的表达及相关机制[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4): 102-104.
- [10] 姚朋飞, 岳稳娜, 曲政海. 肺炎支原体感染小鼠炎症因子的动态变化[J]. 中国组织工程研究, 2015, (B05): 88-89.
- [11] Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, et al. Comparison of PCR for Sputum Samples Obtained by Induced Cough and Serological

Tests for Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Infection in Children[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2006, **13**(6): 708-710.

[12] 祝岩波, 王俊霞. 实验动物泰泽氏菌、肺支原体、兔出血症病毒检测方法的评价[J]. 实验动物科学, 2017, **34**(2):71-74.

[13] 武昱孜, 张旭, 白方方, 等. 猪鼻支原体 3 种核酸检测方法的临床应用比较[J]. 中国预防兽医学报, 2013, **35**(12): 985-988.

[14] 何曼莉, 费磊, 岳华, 等. 3 种定量检测绵羊肺炎支原体方法的比较[J]. 中国畜牧兽医, 2013, **40**(3):177-180.

[15] 甘一迪, 王银银, 任芳丽, 等. 培养细胞污染支原体的 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国医药生物技术, 2011, **06**(4): 295-298.

[16] Daliborka D, Bercic R L, Cizelj I, et al. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells *in vitro* [J]. Veterinary Microbiology, 2009, **138**(1):114-119.

[17] Ueno P M, Timenetsky J, Centonze V E, et al. Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization[J]. Microbiology, 2008, **154**(10):3033-3041.

[18] 邓磊玉, 林戈, 卢光琇. 人胚胎干细胞支原体感染的检测和控制[J]. 现代生物医学进展, 2011, **11**(8): 1451-1453.

[19] Paton G R, Jacobs J P, Perkins F T. Chromosome changes in human diploid-cell cultures infected with *Mycoplasma* [J]. Nature, 1965, **207**(992): 43-45.

Establishment of Real-time Fluorescent Quantitative PCR to Detect Various *Mycoplasma* Commonly Found in Laboratory Animal

XIN Wenting, YANG Yuanyuan, WANG Xinyu, WU Dong, LI Lingen
(Gem Pharmatech Co., Ltd, Nanjing 210061, China)

Abstract: Objective This study aimed at developing a new real-time fluorescent quantitative PCR method for detecting various *Mycoplasma* commonly found in laboratory animal. **Method** In this study, a pair of primers and a Taqman probe were designed based on conserved region of 16 s rRNA gene from various *Mycoplasma* which sensitive to mice and rats, and the amplification efficiency, sensitivity, specificity and repetition of this method were evaluated with standard plasmid. **Result** The result showed the standard curve had a good linear relationship ($R^2=0.9972$), and the amplification efficiency was 98.11%. The lowest detection limitation of this method was 5 copies/ μ L, which was about 100 times higher than the conventional PCR. And this real-time fluorescent quantitatiue PCR method had a strongly specificity for distinguishing the other 8 pathogenic strains. Moreover, it showed the excellent reproducibility with the coefficient of variation of Intra-assay and inter-assay less than 2%. Using this real-time fluorescent quantitative PCR and conventional PCR to detect a batch of clinical samples, the result showed that the positive rate of samples from mice was 3.33% (2/60) and 1.67% (1/60) respectively, and the positive rate of both method of samples from cells was 5% (3/60). **Conclusion** In summary, the real-time fluorescent quantitative PCR method developed in this study was fast, specific and sensitive, and could be applied in detection for *Mycoplasma* of laboratory animal.

Key words: *Mycoplasma*; laboratory animal; Real-time fluorescent quantitative PCR