

弓形虫 529 bp 重复序列基因的 PCR 阳性质控质粒的构建

焦玉萌, 陈兴智, 孙 新, 王雪梅, 方 强

[摘要]目的: 构建含有弓形虫 529 bp 高度重复序列基因的重组质粒, 为基于该基因的弓形虫病分子生物学诊断建立标准阳性对照品。方法: 以弓形虫 RH 株基因组 DNA 为模板, 对 529 bp 的基因片段进行扩增, 将纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接后转入大肠埃希菌 DH-5 α 中, 提取重组质粒 PCR 及测序鉴定。以弓形虫 529 bp 基因为靶基因设计的检测引物, 扩增弓形虫基因组 DNA 及质粒 DNA。结果: PCR 产物序列与 GENBANK 中弓形虫 529 bp 基因序列完全一致。以弓形虫基因组 DNA 和质粒 DNA 为模板, 成功扩增出预期的 249bp 基因片段。结论: 成功构建可作为标准阳性对照品的含有弓形虫 529 bp 高度重复序列基因的重组质粒 pMD-18-Tox, 为经济实用的弓形虫诊断试剂盒的研制奠定了基础。

[关键词] 弓形虫; 重组质粒; 529 bp 高度重复序列; 聚合酶链反应

[中国图书资料分类法分类号] R 382.5 **[文献标识码]** A

Construction of standard control plasmid with repetitive 529 bp DNA fragment of *Toxoplasma gondii* for PCR assay

JIAO Yu-meng, CHEN Xing-zhi, SUN Xin, WANG Xue-mei, FANG Qiang

(Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To establish cloning vector and standard positive control of molecular biology diagnosis of toxoplasmosis based on the 529 bp repetitive fragment to detect the presence of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). **Methods:** The repetitive 529 bp DNA fragment from *T. gondii* was amplified by PCR and was inserted into pMD18-T vectors to construct recombinant plasmid and transformed to *E. coli* DH-5 α . A pair of primers were designed and synthesized based on the 529 bp sequence to amplify the 249 bp fragment gene and plasmid DNA of *T. gondii*. **Results:** The 529 bp DNA fragment of *T. gondii* was successfully amplified and inserted into pMD18-T vectors after purification. The 249 bp fragment was amplified by PCR using *T. gondii* genome DNA and recombinant plasmid DNA as template. **Conclusions:** Successfully cloned assay of 529 bp DNA fragment of *T. gondii* and amplified the 249 bp DNA fragment have laid the foundation of development of *T. gondii* diagnostic kit.

[Key words] *T. gondii*; plasmid repetitive; 529 bp fragment; polymerase chain reaction

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是人畜共患细胞内机会致病性原虫。宿主感染弓形虫后, 免疫功能正常者通常表现为隐性感染, 免疫功能低下时可造成严重后果, 如孕妇、婴幼儿和免疫抑制者感染后, 可能导致流产、畸胎或急性获得性弓形虫病, 病死率甚高, 危害严重^[1]。弓形虫病的传播与流行对畜牧业有较大影响, 尤其对养猪业危害极大, 是猪发生流产和死胎的原因之一, 死亡率高达 30% ~ 40%^[2]。国外学者^[3]在弓形虫基因组鉴定出一个 529 bp 的高度重复序列, 拷贝数约为 200 ~ 300, 因

此建立了特异 PCR 方法。针对该方法, 本实验室前期研究中, 对相应的 PCR 反应体系和反应程序进行了优化, 成功构建了敏感性较好、特异性较强的 PCR 反应体系。本次研究首先扩增弓形虫 529 bp 高度重复序列全长基因, 纯化 PCR 产物, 进行克隆及鉴定, 在此基础上采用先期设计的 249 bp 基因片段引物对重组质粒 DNA 进行 PCR 扩增检测, 验证该引物特异性及稳定性。为寻求可靠、快速、简便的弓形虫诊断方法提供依据, 为弓形虫 PCR 诊断试剂盒阳性质控质粒提供研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 弓形虫 RH 株速殖子 (国际标准强毒株): 本院病原生物学教研室保种。昆明种小鼠, 购自本院实验动物中心。

1.2 引物 引物 1 为先期基于 249 bp 全长基因设计的一对 PCR 检测引物, 引物 2 为参照 Homan 等^[3]所合成的可扩增 529 bp 的全长基因引物 (见表 1)。

[收稿日期] 2010-07-01

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2010CB530001)

[作者单位] 蚌埠医学院 病原生物学教研室, 感染与免疫安徽省重点实验室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 焦玉萌 (1978 -), 女, 讲师。

[通讯作者] 方 强, 博士, 教授, E-mail: fq333@sohu.com

表1 弓形虫 PCR 检测的供试引物对

引物	引物对序列	靶片段大小
引物1	5'-TGG AGC CAC AGA AGG GAC AG-3'	249 bp
	5'-GCC ATC ACC ACG AGG AAA GC-3'	
引物2 (Tox4/Tox5)	5'-CGC TGC AGG GAG GAA GAC GAA AGT TG-3'	529 bp
	5'-CGC TGC AGA CAC AGT GCA TCT GGA TT-3'	

1.3 质粒、感受态细胞 pMD18-T 载体质粒试剂盒为大连 Takara 公司产品,感受态菌株 DH-5 α 本实验室保存。

1.4 主要试剂 Taq 酶、dNTPs 为 Fermentas 公司产品, DNA Marker 100 bp DNA Ladder Plus 为大连宝生物工程有限公司产品, SDS 为上海生工生物工程公司产品, 全血基因组 DNA 极速提取试剂盒为上海飞捷生物技术有限公司产品。

1.5 弓形虫 DNA 提取

1.5.1 弓形虫速殖子的收集 取冻存的刚地弓形虫 RH 株速殖子,经小鼠传代,96 h 后收集感染鼠的腹腔积液。转种 3 代后,灭菌 PBS 冲洗小鼠腹腔,收集腹腔洗涤液,2 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,收集速殖子。

1.5.2 弓形虫速殖子 DNA 的提取 采用全血基因组 DNA 极速提取试剂盒方法进行弓形虫 DNA 的提取。速殖子计数后加入 DE1 液,13 000 r/min 离心 1 min,充分吸去上清,留下细胞团块。加入 DE1 液,以手腕充分用力振荡 10 次,确保形成均一的细胞悬液。加入 DE2 液 600 μ l,以手腕充分振荡 20 次,室温静置 8~10 min,中间振荡 1 次。将样本裂解物倒入内套管中,13 000 r/min 离心 2 min。弃去外套管中液体,内套管中加入 500 μ l 洗液,13 000 r/min 离心 1 min。重复此过程 1 次。取出内套管,弃去外套管中的液体,仍然套回内套管,不加洗液,13 000 r/min 离心 1 min。将内套管取出,放入新的 EP 管中,在膜中央加入洗脱液 100 μ l。室温放置 2 min,13 000 r/min 离心 1 min,获得基因组 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 弓形虫 PCR 529 bp 全长基因扩增 PCR 反应条件:2 mmol/L MgCl₂、0.5 U Taq 酶、50 μ mol/L 引物 2 (Tox4/Tox5)、100 μ mol/L dNTP、1 \times PCR buffer,总体积 25 μ l。PCR 反应程序:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 57 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.7 PCR 扩增产物的克隆

1.7.1 重组质粒的构建 DNA 胶回收试剂盒切胶

回收 PCR 产物(北京道普生物技术开发中心),在微量离心管中加入 pMD18-T 载体 1 μ l,PCR 纯化产物 2 μ l,混匀,16 $^{\circ}$ C 反应 30 min。

1.7.2 重组质粒的转化 将上面制备的 10 μ l 全量的重组质粒加入已经制备好的 100 μ l DH-5 α 感受态细胞中,混合均匀,冰浴 30 min,42 $^{\circ}$ C 热休克 45 s,再冰中放置 1 min,加入 890 μ l 的 SOC 培养基,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 60 min (<220 r/min),使细菌复苏,并表达质粒上的抗性基因,取 100 μ l 菌液涂布于含 Amp、IPTG、X-gal 的平板上,涂 3 个平板,待液体吸收后,置 37 $^{\circ}$ C 温箱中倒置培养 12~16 h,取出平皿发现有蓝白斑,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.7.3 重组质粒的筛选 在平板上挑取白色单菌落即阳性单个克隆,在含氨苄西林(100 μ g/ml)培养液中振荡培养(200 r/min)3~4 h,待菌液混浊直接取菌液进行菌落 PCR 扩增,得到预期的 529 bp 条带,说明该重组子转化进入大肠埃希菌中。

1.7.4 重组质粒的鉴定 采用碱裂解法大量抽提质粒,对提取的重组质粒进行 PCR 鉴定,并将重组质粒送天津生物有限公司进行测序鉴定。

1.8 弓形虫检测引物 1 的扩增 利用前述 PCR 反应体系和反应条件,将提取的弓形虫基因 DNA 与质粒 DNA 分别进行 PCR 扩增。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

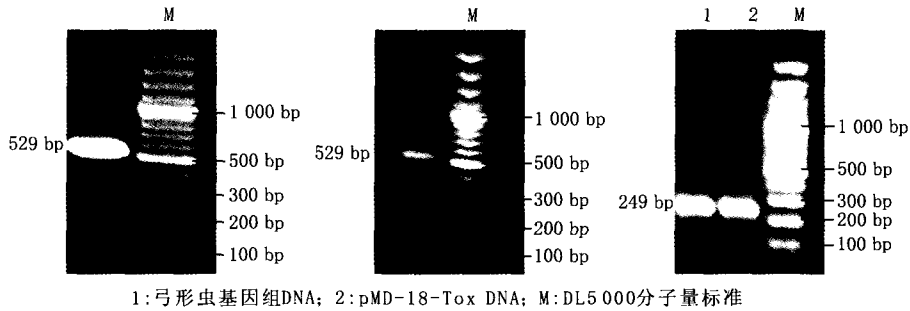
2.1 PCR 扩增弓形虫 529 bp 基因全序列 弓形虫 RH 株提取的 DNA 经 PCR 成功扩增出 529 bp 的 DNA 片段,与预期目的片段长度相符(见图 1)。

2.2 重组质粒的筛选及 PCR 鉴定 PCR 产物连接入 T 载体所构建的重组质粒,经 LB 平板筛选,获得克隆,挑选白色克隆株,用含氨苄西林 LB 培养液培养,重组质粒用菌落 PCR 鉴定,出现阳性条带说明重组成功。碱裂解法抽提质粒后再做 PCR 出现目的条带(见图 2)。

2.3 阳性质控质粒的验证 利用先期设计的小片段检测引物对提取的弓形虫基因 DNA 与质粒 DNA 进行 PCR 扩增,均扩增出明显的特异性 249 bp 条带(见图 3)。

3 讨论

弓形虫是一种专性寄生于人和动物有核细胞内的机会致病原虫,在世界范围内广泛分布,引起人和动物弓形虫病。人类普遍易感,据估计全世界有 5~10 亿人感染弓形虫^[4]。目前的诊断方法主要有



1:弓形虫基因组DNA; 2:pMD-18-Tox DNA; M:DL5 000分子量标准
图 1 弓形虫529 bp DNA片段的PCR产物电泳分析; 图 2 pMD-18-Tox 529 bp 重组质粒模板的PCR产物电泳分析; 图 3 弓形虫249 bp DNA片段的PCR产物电泳分析

病原学诊断、免疫学诊断、分子生物学检测^[5-7]等。鉴于弓形虫病的严重危害以及传统的病原及免疫学方法的局限性,在这些诊断方法中,PCR 检测技术以其特异性强、灵敏度高、操作简便、省时等特点^[3],成为一种主要的弓形虫病诊断方法。PCR 检测方法中较为常见的有原位 PCR、荧光定量 PCR、普通 PCR 方法等。其中原位 PCR 特异性较差、容易出现假阳性,且扩增效率较低;荧光定量 PCR 劳动强度大、定量不准确、重复性差^[8-11]。普通 PCR 方法是体外合成特异 DNA 片段的一种方法,敏感性主要取决于目的 DNA 片段在基因组的拷贝数,在短时间内目的 DNA 得以迅速扩增,得到大量的目的片段,已是国内外学者研究的重点。目前弓形虫的 PCR 诊断方法中研究较多的为 35 个拷贝数的 B1 基因、p30 基因、ITS-1 基因等^[8-10]。Homan 等^[3]从弓形虫基因组中鉴定出 200~300 个拷贝的 529 bp DNA 片段,其拷贝数较高,对比发现 PCR 检测敏感性是 B1 基因的 10 倍^[12]。因此可将其作为弓形虫 PCR 诊断中较为理想的靶基因。鉴于以上特点,本实验采用 Homan 等^[3]报道的扩增 529 bp 重复 DNA 片段的引物,扩增出整段基因,通过克隆转化到载体后,提取质粒,进行 PCR 鉴定。成功构建该 PCR 及克隆体系后,先期基于 529 bp 重复序列设计的引物 1,对弓形虫基因 DNA 和质粒 DNA 进行扩增,均成功扩增出 249 bp 的特异性目标靶带,表明该阳性质粒构建成功,并较好的验证了已有 PCR 体系的可靠性。

在弓形虫病的分子检测体系中,标准化阳性对照可以用于确定检测体系的可靠性和稳定性,避免因样品存在抑制因子或其他原因而导致的假阴性。本实验中,基于 529 bp 重复序列上设计的一段 249 bp 的引物 1,成功验证了已有 PCR 体系的可靠性。理论上小片段基因在扩增效率、引物错配等方面应优于可扩增出 529 bp 全长的引物。鉴于以上特点,在引物 1 的基础上可进行 DNA 重组技术的构建,并将其弓形虫重组质粒作为 PCR 反应的标准化

阳性对照体系,从而确立检测体系的准确性和可靠性。另外重组质粒因其具有易于制备、长期保存等特点,可以在生物标准化检测试剂的组装中节约检测费用和时间,为经济适用、快捷简便的弓形虫 PCR 检验试剂盒的研制奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Frenkel JK. Pathophysiology of toxoplasmosis[J]. Parasitol Today, 1988, 4(10):273-278.
- [2] Szenasi Z, Ozsvar Z, Nagy E, et al. Prevention of congenital toxoplasmosis in Szeged, Hungary[J]. Int J Epidemiol, 1997, 26(2):428-435.
- [3] Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, et al. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnosis and quantitative PCR[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(1):69-75.
- [4] 孙新, 李朝品, 张进顺. 实用医学寄生虫学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:159-168.
- [5] Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent development for diagnosis of Toxoplasmosis[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3):941-945.
- [6] Switaj K, Master A, Skrzypczak M, et al. Recent trends in molecular diagnosis for *Toxoplasma gondii* infections[J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(3):170-176.
- [7] 廖申权, 翁亚彪, 宋慧群, 等. 猪弓形虫病的诊断与药物治疗的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(4):371-374.
- [8] Switaj K, Master A, Skrzypczak M, et al. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections[J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(3):170-176.
- [9] Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003, 45(4):269-271.
- [10] Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(6):2065-2071.
- [11] Montoya JG, Rosso F. Diagnosis and management of toxoplasmosis[J]. Clin Perinatol, 2005, 32(3):705-726.
- [12] Kourenti C, Karanis P. Development of a sensitive polymerase chain reaction method for the detection of *Toxoplasma gondii* in water[J]. Water Sci Technol, 2004, 50(1):287-291.

(本文编辑 刘畅)