

实时荧光定量 PCR 检测斑点热立克次体方法的建立

罗婉蓉, 刘伯玉, 陈振, 任翠平, 高越, 杨莉, 朱禹, 余东阳, 柳燕

摘要 目的 建立斑点热群立克次体(SFGR) TaqMan 实时荧光定量 PCR(qPCR)快速检测方法。方法 根据日本斑点热立克次体外膜蛋白 A(*ompA*) 基因序列设计特异性引物和探针, 建立基于 TaqMan 探针的实时荧光定量 PCR 检测方法, 对其特异性、灵敏性、重复性进行检测, 用建立的此检测方法和常规的巢式 PCR 方法同时对临床收集的 80 份患者血标本进行检测并比较两者结果。结果 成功建立了检测 SFGR 的实时荧光定量 PCR 方法, 标准曲线的循环阈值与模板拷贝数均呈良好的线性关系($r > 0.99$), 且在检测 SFGR 核酸样本时具有良好的灵敏度、特异性和重复性。结论 该研究建立了基于 TaqMan 探针检测 SFGR 的实时荧光定量 PCR 检测方法, 为临床实验室快速确诊 SFGR 疾病提供了快速、有效的技术手段。

关键词 斑点热立克次体; *ompA*; TaqMan 探针; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 R 376.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1008-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.005

斑点热是一种由斑点热群立克次体(spotted fever group rickettsiae, SFGR)感染引起、经蜱虫叮咬传播的人畜共患疾病。目前国际上已证明有 19 种 SFGR 对人类有致病性^[1]。国内已鉴定的 SFGR 有 5 种: *R. heilongjiangensis*、*Candidatus R. tarasevichiae*^[2-7]。斑点热的临床表现为发热、皮疹、头痛、局部淋巴结肿大等^[1]。病程早期缺乏特异性临床症状, 患者往往因为误诊而延误病情, 严重时可致死亡^[8]。若患者能在早期得到快速准确的诊断, 并给予抗菌药物则可以被治愈, 减少死亡率。目前, 斑点热的实验室诊断技术包括常用但缺乏特异性、敏感性的血清学检测和分子生物学检测。其中巢式 PCR 与常规 PCR 比较具有更高的特异性^[9-10], 但操作相对繁琐。分离培养斑点热立克次体是确诊最直接、最可靠的依

据^[11], 但是耗时且有一定技术要求, 难以在一般实验室开展。因此, 建立快速检测立克次体感染的方法就显得尤为重要。

实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)技术是一种敏感特异的核酸检测方法, 可用于病毒、细菌的快速检测^[12]。该研究运用 qPCR 技术, 根据 SFGR 外膜蛋白 A 基因(*outer membrane protein A ompA*)建立 SFGR 的快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象 日本斑点热立克次体(*R. japonica* Anhui 120 strain, 本实验室分离培养并保存菌种); 其他立克次体属病原体(斑疹伤寒立克次体、恙虫病东方体、无形体) DNA 以及常见非立克次体病原菌(大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、支原体、螺旋体) DNA。

1.2 试剂及仪器 PCR 仪(德国 Biometra 公司); 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司); 琼脂糖凝胶成像仪器(上海勤翔科学仪器有限公司); Nano-drop2000 分光光度计(美国 ThermoFisher 公司); DNeasy Blood & Tissue Kit(德国 QIAGEN 公司); pMD18-T Vector Cloning Kit、Gel DNA Extraction Kit、Premix Taq-Premix Ex Taq、DL2000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司); 琼脂糖凝胶(西班牙 BOWEST 公司); Plasmid Miniprep Kit(美国 AXYGENT 公司)。引物和探针由通用生物系统(安徽合肥)有限公司合成。

1.3 引物和探针的设计与合成 参考 GenBank 中 *Rickettsia japonica* strain Anhui 120 *ompA* 基因序列(序列号: KY484160.1)以及 *R. heilongjiangensis* 054 *ompA* 基因序列(序列号: AF179362.2)、*R. raoultii* strain Khabarovsk *ompA* 基因序列(序列号: AH015610.2), 利用 Beacon Designer 引物设计软件设计斑点热立克次体 *ompA* 基因特异性引物和探针(表 1)。将设计好的引物和探针在 NCBI 官网上进行 Primer-BLAST 分析, 验证该对引物和探针的特异性。

1.4 阳性标准品的构建 用 DNeasy Blood&Tissue Kit 提取日本斑点热立克次体(Anhui120 株)培养物核酸。使用本实验常规使用的两对巢式 PCR 引物(表 1)扩增斑点热立克次体 *ompA* 基因。一轮 PCR

2020-03-20 接收

基金项目 “十三五”国家科技重大专项(编号: 2018ZX10711001); 国家自然科学基金(编号: 81571963、81772203)

作者单位: 安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 罗婉蓉, 女, 硕士研究生;

柳燕, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yanliu@ahmu.edu.cn

反应体系 25 μl : 2 $\times$ Premix Taq 反应液 12.5 μl , 上、下游引物(*ompA* -70F、*ompA* -701R) 各 0.7 μl , 模板 5 μl , 去离子水补足体系。二轮 PCR 反应体系 25 μl : 2 $\times$ Premix Taq 反应液 12.5 μl , 上、下游引物(*ompA* -180F、*ompA* -602R) 各 0.7 μl , 模板 1 μl , 去离子水补足体系。相同的 PCR 反应条件参数设置: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 39 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。配制 1.2% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳鉴定, 切胶回收目的条带。按照 pMD18-T Vector Cloning Kit 说明书将 *ompA* 基因片段克隆到 T 载体上, 并转化到 DH5 α 大肠杆菌中。通过蓝白斑筛选以及菌落 PCR(表 1) 鉴定, 筛选出含阳性重组质粒菌液后收集菌液标本进行基因测序。将测序结果进行 BLAST 分析验证, 符合试验预期的阳性重组质粒可作为 qPCR 的阳性标准品。大量培养含重组质粒的细菌提取重组质粒, Nanodrop2000 分光光度计测量 DNA 浓度, 计算拷贝数。将制备好的标准品分装后置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。

表 1 PCR 引物序列

来源	靶基因	引物探针序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
日本斑点热 立克次体 (qPCR)	<i>ompA</i>	<i>ompA</i> -F: CACCACCGTAAGTAAATG <i>ompA</i> -R: GCGATAATGCTGAGTAGTA <i>ompA</i> -probe: FAM-TGAGGACCACGACAG GATTAC-TAMRA	184
	<i>ompA</i>	<i>ompA</i> -70F: ATGGCGAATATTCTCCAAAA <i>ompA</i> -701R: GTTCCGTTAATGGCAGCATCTG	632
	<i>ompA</i>	<i>ompA</i> -480F: GCAGCGATAATGCTGAGTA <i>ompA</i> -602R: AGTGACGATTCGCTCCCCCT	455
pMD18-T (菌落 PCR)	RV-M:	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA M13-47: CGCCAGGGTTTTCACAGTCACGAC	95

1.5 反应条件的优化及标准曲线的建立 按照 Premix Ex Taq(Probe qPCR) 试剂盒说明书配制 20 μl 的 qPCR 反应体系, 引物浓度 0.1、0.2、0.4 $\mu\text{mol/L}$, 探针浓度 0.4、0.5、0.6 $\mu\text{mol/L}$ 进行 TaqManqPCR 反应, 对反应条件进行优化。分别以质粒含量为 1.9×10^8 、 1.9×10^7 、 1.9×10^6 、 1.9×10^5 、 1.9×10^4 、 1.9×10^3 、 1.9×10^2 、 1.9×10^1 和 1.9×100 拷贝作为模板, 用优化后的反应条件进行扩增, 获得扩增动力学曲线。以标准品起始浓度的常用对数为横坐标, 以循环阈值纵坐标, 推导出标准曲线。

1.6 特异性检测 用优化后的 TaqManqPCR 条件分别对 SFGR(日本斑点热立克次体)、立克次体科其他常见病原体(斑疹伤寒立克次体、恙虫病东方

体、无形体)、常见非立克次体病原菌(大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、螺旋体、支原体) DNA 进行 qPCR 检测。

1.7 敏感性试验 分别对质粒含量为 1.9×10^3 、 1.9×10^2 、 1.9×10^1 、 1.9×100 和 1.9×10^{-1} 拷贝的标准品进行检测, 以优化后的条件进行 TaqMan qPCR 检测, 明确建立方法的最低检测限。

1.8 重复性试验 用建立的 TaqMan qPCR 方法分别对质粒含量为 1.9×10^6 、 1.9×10^5 、 1.9×10^4 、 1.9×10^3 和 1.9×10^2 拷贝的标准品进行检测, 每种质粒含量重复 3 次, 计算变异系数。再以相同标准质粒为模板, 在不同时间段进行 3 次独立重复试验, 以分析组间差异。

1.9 临床样品检测 对来自临床采集的 80 份不明原因发热患者的血标本进行核酸提取。用建立的 TaqMan qPCR 检测方法和巢式 PCR 方法同时对该临床患者血标本核酸进行检测, 计算 2 种检测方法之间的符合率。

1.10 统计学处理 质粒构建及测序结果分析采用 Lasergene 7.0 软件。分别用 SPSS 20.0 及 GraphPad Prism 5.0 软件进行描述性统计分析和作图。两种 PCR 方法阳性率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

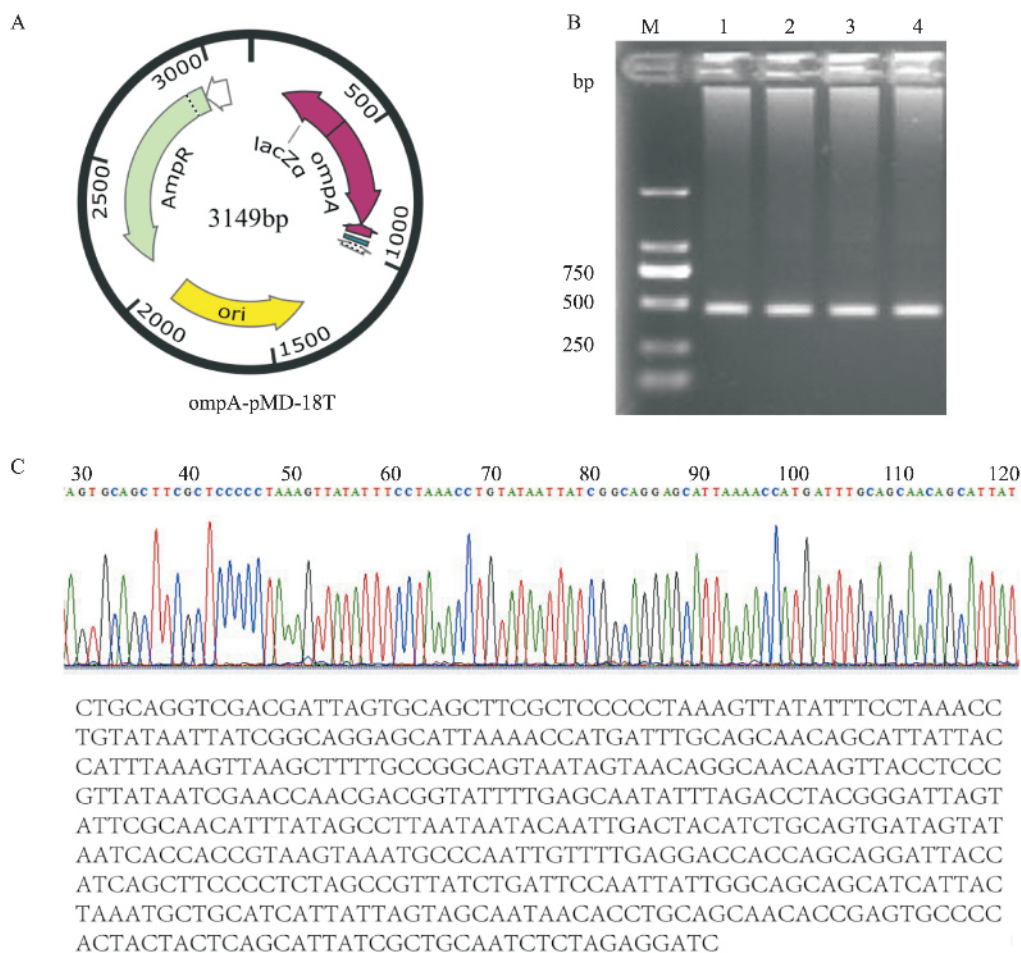
2 结果

2.1 重组质粒的构建 *ompA* 基因经巢式 PCR 扩增后, 目的条带大小为 455 bp。将目的条带插入到 T 载体中构建重组质粒并测序验证。见图 1。

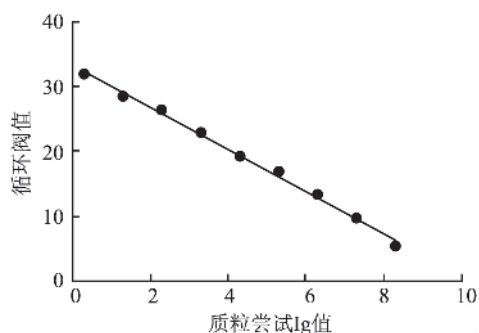
2.2 TaqManqPCR 标准曲线 优化后的 TaqMan qPCR 最佳反应体系是: Premix Ex Taq (Probe qPCR) 10 μl , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μl , 探针(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μl , 模板 2 μl , 灭菌去离子水补足至 20 μl 体系。以各标准品中质粒浓度的常用对数值为横坐标, 以循环阈值为纵坐标, 获得 *ompA* qPCR 标准曲线: $Y = -3.220X + 33.162$, 相关系数为 0.996, 扩增效率为 104.6%, 表明建立的 TaqMan qPCR 方法具有良好的线性关系, 见图 2。

2.3 TaqMan qPCR 的特异性分析 建立的 qPCR 方法仅对斑点热立克次体 *ompA* 有阳性扩增信号, 其他常见病原体包括普氏立克次体、恙虫病东方体、无形体、埃里克体、大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌均为阴性, 表明建立的 TaqMan qPCR 方法特异性强, 见图 3。

2.4 TaqMan qPCR 的灵敏性分析 建立的 qPCR

图1 插入 *R. janponica* (Anhui120 株) *ompA* 基因重组质粒的构建与鉴定

A: 插入 *ompA* 基因的重组质粒示意图; B: *ompA* 基因 PCR 扩增电泳图(泳道 M: 2 000 bp Marker; 泳道 1~4 均为 *ompA* 基因扩增片段); C: 重组 *ompA* 质粒的测序峰图和插入基因序列

图2 *ompA* 基因 TaqMan qPCR 标准曲线

方法对质粒含量为 1.9×10^3 、 1.9×10^2 、 1.9×10^1 、 1.9×10^0 和 1.9×10^{-1} 拷贝有阳性扩增信号,对 1.9×10^0 、 1.9×10^{-1} 拷贝均未检测到扩增信号,表明本研究建立的方法的最低检测限为 19 拷贝。见图 4。

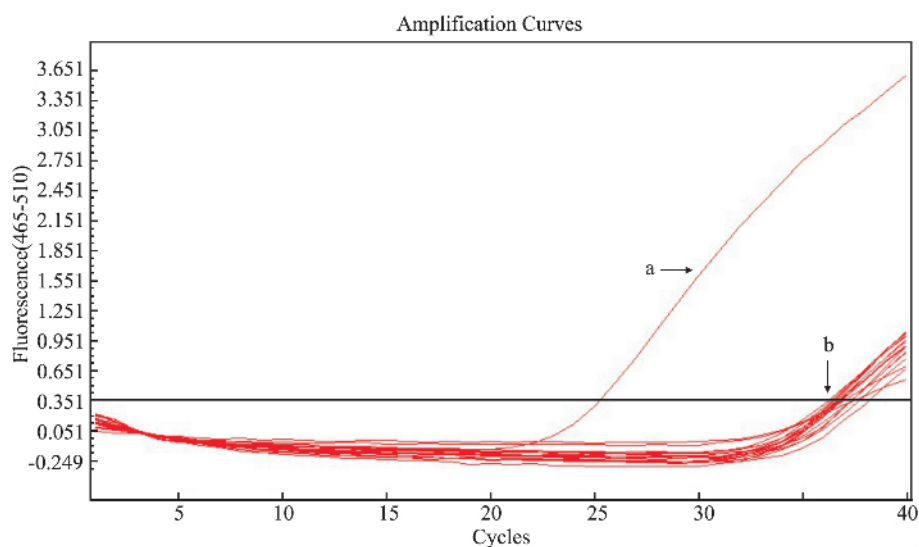
2.5 TaqMan qPCR 的重复性分析 建立的 TaqMan qPCR 检测质粒含量为 1.9×10^6 、 1.9×10^5 、 1.9×10^4 、 1.9×10^3 和 1.9×10^2 拷贝标准品的组间变

异系数为 0.56% ~ 1.47% 组间变异系数为 1.01% ~ 2.29%, 见表 2。

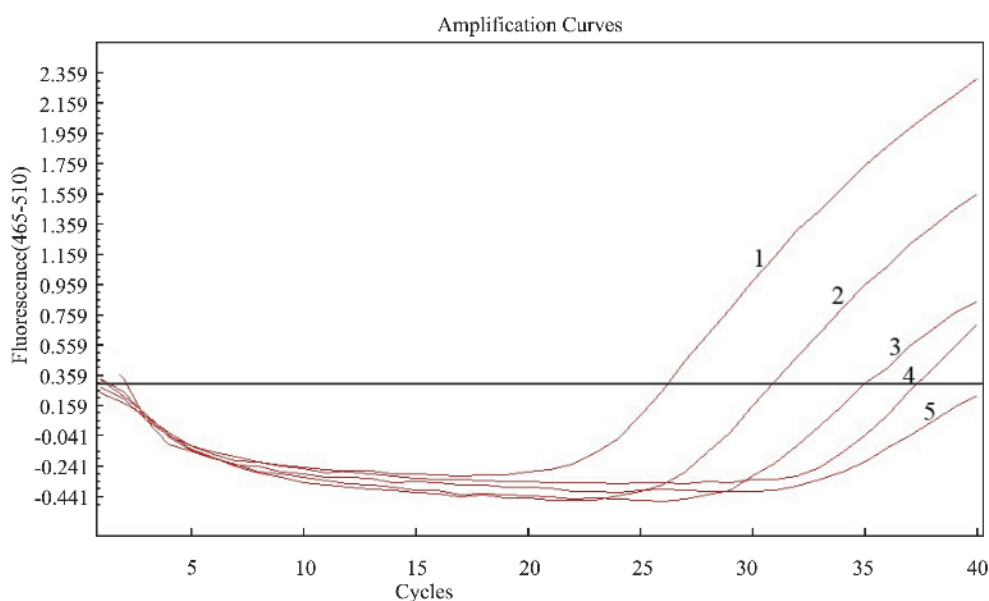
表 2 TaqMan 探针 qPCR 重复性试验结果

重复性	质粒 拷贝数	Ct 值			平均值	标准差	变异系数 (%)
		1	2	3			
组内	1.9×10^6	13.22	13.47	13.09	13.26	0.16	1.18
	1.9×10^5	14.76	14.42	14.81	14.66	0.17	1.16
	1.9×10^4	18.12	18.77	18.3	18.4	0.27	1.47
	1.9×10^3	21.33	21.54	21.26	21.38	0.12	0.56
	1.9×10^2	25.33	25.8	25.62	25.58	0.19	0.74
组间	1.9×10^6	13.44	13.26	13.06	13.25	0.16	1.17
	1.9×10^5	16.01	15.79	15.27	15.99	0.31	1.98
	1.9×10^4	19.26	18.21	18.79	18.75	0.43	2.29
	1.9×10^3	22.94	22.3	22.07	22.44	0.37	1.64
	1.9×10^2	26.35	25.71	25.97	26.01	0.26	1.01

2.6 TaqMan qPCR 方法对临床样品检测 普通 PCR 阳性的样品经 TaqMan qPCR 的检测方法检测均为阳性,两种检测方法的一致率为 91.25%。2 种检测方法比较差异有统计学意义($\chi^2 = 5.14$ $P < 0.05$)。

图3 *ompA* 基因 TaqMan qPCR 特异性结果

a: 日本斑点热立克次体 DNA; b: 其他常见病原体普氏立克次体、恙虫病东方体、无形体、埃里克体、大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌 DNA 均为阴性

图4 *ompA* 基因 TaqMan qPCR 敏感性结果

1~5: 标准品质粒浓度为 1.9×10^3 、 1.9×10^2 、 1.9×10^1 、 1.9×10^0 和 1.9×10^{-1} 拷贝

表明对 80 份临床病人标本核酸进行检测 TaqMan-qPCR 方法较巢式 PCR 敏感性更高。见表 3。

表3 两种 PCR 方法对临床样品的检测结果

临床 样本数	巢式 PCR		荧光定量 PCR		一致率 (%)
	阳性	阳性率 (%)	阳性	阳性率 (%)	
80	1	1.25	8	10	91.25

3 讨论

国内的斑点热立克次体流行病学调查开始于 1958 年。长期的研究调查显示斑点热立克次体分

布较广,至今已有十几个省市、自治县证实存在斑点热立克次体感染,从患者、蜱、蜱虫卵以及啮齿动物体内共分离出 20 余株 SFGR,流行病学调查显示人群对该群病原体普遍易感^[7,13]。目前根据 SFGR 17 ku 抗原、*gltA*、*geneD*、*ompA* 基因,已经建立了多种 PCR 鉴定方法^[14]。其中 *ompA* 作为斑点热立克次体细胞膜表面蛋白,在立克次体的感染与免疫中发挥重要作用,如介导立克次体黏附和入侵宿主细胞、促进立克次体在细胞内生长繁殖以及诱导机体的免疫应答等^[15]。

Regnery et al^[16] 根据立氏立克次体 *ompA* 基因

设计的一对引物 Rr190.70p (5'-ATGGCGAAT ATTTCTCCAAA-3') 和 Rr190.602n (5'-AGTGCAG CATTCGCTCCCCCT-3') 其扩增序列结合限制性内切酶片段长度多态性图谱法(PCR/RFLP)被广泛应用于斑点热立克次体新种的鉴定。此方法能区别具有高度遗传同源性的 SFGR, 在于这对引物扩增的目的片段既有 SFGR 的保守序列, 又具有 SFGR 不同种之间特殊酶切位点, 可以通过不同的限制性内切酶消化区别 SFGR 不同的种。本实验通过巢式 PCR(两对引物 *ompA* -70F 和 *ompA* -701R、*ompA* -180F 和 *ompA* -602R) 扩增出 SFGR 的保守序列, 再根据这段保守序列设计特异性的引物和探针, 建立检测斑点热立克次体的 TaqMan qPCR 方法。

评估建立的 qPCR 方法的 3 项重要指标包括: 特异性、敏感性和重复性。本实验在进行特异性分析时, 选择斑疹伤寒立克次体、恙虫病东方体、无形体, 以及大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、螺旋体、支原体这 7 种病原体 DNA 与 SFGR DNA 同时进行 TaqMan qPCR 检测。前 3 种与 SFGR 属于立克次体科下的不同种属, 后四种为临床较为常见的病原体。结果显示 SFGR 核酸扩增有阳性信号, 而其他 7 种均为阴性结果, 显示该方法具有较好的种属特异性。对重组质粒标准品进行 10 倍梯度稀释检测, 最低可检测出 19 拷贝, 表明该方法具有良好的检测灵敏度。对同一批次标准品进行组内和组间重复性分析时, 两者变异系数均低(最高仅为 1.47% 和 2.29%), 结合构建重组质粒作为试验的标准品可大量获取以及长期保存的特点, 可以有效保障后续开发标准化诊断试剂盒标准品的一致性。将建立的 TaqMan qPCR 方法与巢式 PCR 同时对临床患者样本进行检测, 巢式 PCR 检测有 1 份阳性, 阳性率为 1.25%, 荧光定量 PCR 检测有 8 份阳性, 阳性率为 10.00%, 巢式 PCR 检测阳性标本用荧光定量 PCR 检测为阳性, 一致率为 91.25%。两种方法比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 且荧光定量 PCR 检测的灵敏度高于巢式 PCR 在检测较低立克次体含量样本时有一定的应用价值。荧光定量 PCR 反应时间短, 一般 45 min ~ 1 h 就能完成反应有利于结果的快速输出。因此本实验建立的检测斑点热立克次体 TaqMan qPCR 方法可应用于实验室对疑似斑点热患者样本的快速诊断。

参考文献

- [1] Wood H, Artsob H. Spotted fever group rickettsiae: a brief review and a Canadian perspective [J]. Zoonoses Public Health 2012 59 Suppl 2: 65 - 79.
- [2] 吴益民, 魏安明, 胡玲美, 等. 黑龙江立克次体蜱传斑点热的病原学研究 [J]. 中国公共卫生 2001 17(7): 604 - 6.
- [3] Jia N, Zheng Y C, Jiang J F, et al. Human infection with *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* [J]. N Engl J Med 2013 369(12): 1178 - 80.
- [4] Jia N, Jiang J F, Huo Q B, et al. *Rickettsia sibirica* subspecies *sibirica* BJ-90 as a cause of human disease [J]. N Engl J Med 2013 369(12): 1176 - 8.
- [5] Jia N, Zheng Y C, Ma L, et al. Human infections with *Rickettsia raoultii*, China [J]. Emerg Infect Dis 2014 20(5): 866 - 8.
- [6] Lu Q, Yu J, Yu L, et al. *Rickettsia japonica* infections in Humans, Zhejiang Province, China, 2015 [J]. Emerg Infect Dis 2018 24(11): 2077 - 9.
- [7] Li J, Hu W, Wu T, et al. Japanese spotted fever in Eastern China, 2013 [J]. Emerg Infect Dis 2018 24(11): 2107 - 9.
- [8] Mansueto P, Vitale G, Cascio A, et al. New insight into immunity and immunopathology of Rickettsial diseases [J]. Clin Dev Immunol 2012 2012: 967852.
- [9] 李素华, 李静, 高丽君, 等. 荧光定量 PCR 在疟疾实验室诊断中的应用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 2019 37(2): 232 - 4.
- [10] 金艳, 王明丽, 赵俊, 等. 荧光定量 PCR 法和巢式 PCR 法检测新生儿脐血人巨细胞病毒 DNA 的比较 [J]. 安徽医科大学学报 2011 46(2): 193 - 6.
- [11] Angelakis E, Richet H, Rolain J M, et al. Comparison of real-time quantitative PCR and culture for the diagnosis of emerging Rickettsioses [J]. PLoS Negl Trop Dis 2012 6(3): e1540.
- [12] Rodriguez A, Rodriguez M, Cordoba J J, et al. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods [J]. Methods Mol Biol 2015 1275: 31 - 56.
- [13] 张丽娟, 付秀萍, 范明远. 我国立克次体研究与立克次体病的流行现状 [J]. 热带病与寄生虫学 2005 3(1): 37 - 42.
- [14] Parola P, Labruna M B, Raoult D. Tick-borne rickettsioses in America: unanswered questions and emerging diseases [J]. Curr Infect Dis Rep 2009 11(1): 40 - 50.
- [15] Chan Y G, Riley S P, Martinez J J. Adherence to and invasion of host cells by spotted fever group rickettsia species [J]. Front Microbiol 2010 1: 139.
- [16] Regnery R L, Spruill C L, Plikaytis B D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes [J]. J Bacteriol 1991 173(5): 1576 - 89.

网络出版时间: 2020-6-29 11:26 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.006.html>

干扰 VIRMA 基因对胃癌细胞迁移的影响和机制研究

代聪聪 吴立胜 缪冉 朱志强

摘要 目的 观察和分析干扰 VIRMA 基因对胃癌细胞迁移能力的影响,并初步探究其机制。方法 慢病毒转染干扰 MGC803 和 SGC7901 胃癌细胞中 VIRMA 基因的表达;使用 CCK-8 法检测胃癌细胞的增殖能力;细胞划痕实验和 Transwell 小室实验检测各组胃癌细胞的迁移能力;实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法检测 VIRMA 及 FN1 的 mRNA 及蛋白表达相关情况。结果 在胃癌细胞中 VIRMA 基因表达被慢病毒抑制后,其 mRNA 量及蛋白表达有所下降 ($P < 0.05$);CCK-8 法结果显示干扰 VIRMA 基因使胃癌细胞的增殖能力受到了抑制 ($P < 0.05$);干扰组胃癌细胞的 24 h 划痕愈合距离变少,穿膜细胞数相比于对照组也减少 ($P < 0.05$);干扰 VIRMA 基因后 FN1 的表达量下降 ($P < 0.05$)。结论 慢病毒介导的抑制 VIRMA 表达,可以抑制胃癌 MGC803 及 SGC7901 细胞的迁移能力,其机制可能和调控 FN1 的表达水平有关。

关键词 VIRMA; 胃癌; 细胞迁移; FN1; CCK-8

中图分类号 R 735.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1013-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.006

胃癌是人类世界癌症医学中最艰难的挑战之一,其发病率在东亚最高,且其致死率也排在恶性肿瘤的前列。胃癌是中国最为常见的癌症之一,仅次于肺癌。伴着医疗行业整体的不停进步,胃癌的诊断方法及治疗手段得到很大程度的提升,但胃癌的局部复发和远处转移依然影响着患者的生存预后,胃癌病人现阶段的 5 年生存率仍不能达到比较满意的水平^[1-2]。因此,探索影响胃癌转移机制的生物新靶点对于提高胃癌患者生存预后有重大意义。

6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A) 属于真核生物 mRNA 转录后修饰中含量最为丰富的一种方式,对调节 mRNA 剪接、翻译和稳定性等方面有着非常重要的影响。m6A 动态调控蛋白包含甲基转移酶 (Writers)、去甲基化酶 (Erasers) 及读取基因 (Readers) 这三类^[3]。甲基转移酶被发现是一种可以催化甲基化过程的多因子复合物,是由 METTL3、

2020-03-10 接收

基金项目: 安徽省公益性技术应用研究联动计划项目 (编号: 1604f0804013)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普通外科,合肥 230001

作者简介: 代聪聪,男,硕士研究生;

吴立胜,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, wlisheng1210@163.com

Establishment of a TaqMan-based real-time PCR method of spotted fever group rickettsiae

Luo Wanrong, Liu Boyu, Chen Zhen, et al

(Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To establish a TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR of spotted fever group rickettsiae (SFGR). **Methods** According to the *ompA* gene sequence of *Rickettsia japonica*, the specific primers and probes were designed to develop the TaqMan-based Real-time PCR method. The specificity, sensitivity and repeatability of the established method were verified. The established TaqMan real-time PCR method was used to detect SPGR infection in 80 clinic blood samples collected in Anhui Province and compared with the nested PCR. **Results**

The real-time quantitative PCR method for detecting SPGR was successfully established. The cyclic threshold of the standard curve and the template copy number showed a good linear relationship ($r > 0.99$). This method had strong specificity, high sensitivity and good repeatability in the detection of the spotted heat rickettsial nucleic acid samples. **Conclusion** This study establishes a real-time quantitative PCR assay based on TaqMan probe to detect SPGR, which provides a rapid and effective technical means for rapid diagnosis in clinical laboratories.

Key words spotted fever group rickettsiae; *ompA*; TaqMan probe; real-time fluorescent quantitative PCR