

# 检测弓形虫的 PCR 法和 ELISA 法的比较

李 健<sup>1</sup> 李克秋<sup>1</sup> 杨秀珍<sup>2</sup> 刘佩梅<sup>2</sup>

(天津医科大学 1. 生物学教研室 天津 300070 ; 2. 寄生虫学教研室)

[摘要] 目的 :建立快速、敏感、特异的 PCR 方法 ,用于检测弓形虫感染。方法 :选择弓形虫 B1 基因 194bp 片段作为扩增模板 ,优化反应条件 ,并测定其敏感性和特异性 ;以 10<sup>4</sup> 弓形虫 RH 株速殖子腹腔接种小鼠 ,用 PCR 法检测感染动物全血 DNA ,并与 ELISA 法检测血清 IgM 进行比较。结果 :本实验中 ,PCR 方法的检测阈值为 0.2 pg 弓形虫 DNA ,并且与人、小鼠、疟原虫、旋毛虫等 DNA 均无交叉反应。用 PCR 法检测感染动物全血 DNA ,感染后第 2 d 即可测出阳性 ,总阳性数为 13( 13/15 ) ,而 ELISA 法检测血清 IgM 则到感染后第 6 d 才测出阳性 ,总阳性数为 2( 2/15 ) 。经统计学检验 ,二者存在显著差异 ( P<0.05 ) 。结论 :PCR 是一种快速、敏感、特异的检测方法 ,可用于弓形虫病的早期诊断。

[关键词] 弓形虫; 聚合酶链式反应; 酶联免疫吸附试验

[中图分类号] R382.5+R446

[文献标识码] A

[文章编号]1006- 8147(2006)01- 0027- 03

## Comparison of a PCR assay with an ELISA assay for the detection of *Toxoplasma gondii*

LI Jian<sup>1</sup>, LI Ke-qiu<sup>1</sup>, YANG Xiu-zhen<sup>2</sup>, LIU Pei-mei<sup>2</sup>

( 1. Department of Medical Biology of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Parasitology)

**ABSTRACT** Objective: To establish a rapid PCR assay with high sensitivity and specificity for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA. Methods: A 194 segment of B1 gene was taken as the mode to perform PCR, and the reaction condition was optimized. Moreover, the sensitivity and specificity were determined. In addition, the mice were injected intraperitoneally with 10<sup>4</sup> tachyzoites, and then the blood specimens and serum samples were collected to perform a PCR assay and an ELISA assay for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA and IgM respectively, and their results were compared. Results: In this study, the detection threshold was 0.2pg *Toxoplasma gondii* DNA. Moreover, there was not any cross- reaction with the DNA from Human beings, mice, *Plasmodium yoelii* and *Trichinella spiralis*. Besides these, *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples were identified by PCR on the second day after inoculation, and total number of positive specimens was 13( 13/15 ), whereas the IgM in serum were detected by ELISA only on the sixth day after inoculation, and the total number of positive specimens was 2( 2/15 ). Statistically, there was significant difference between the positive number of blood samples and that of serum specimens ( P<0.05 ). Conclusion: The PCR assay is a rapid method with high sensitivity and specificity, and it can be used as a diagnostic test at early stage of *Toxoplasma gondii* disease.

**KEY WORDS** *Toxoplasma gondii*; PCR; ELISA

弓形虫是细胞内寄生原虫 ,人群感染相当普遍。免疫功能正常的人群感染后一般无临床症状 ,但对于免疫功能受损及缺陷患者 ,以及孕妇 ,则往往产生严重危害<sup>[1]</sup>。在检测弓形虫的方法中 ,病原学方法是

最可靠的 ,但因其取材困难 ,费时费力 ,不适用于临床诊断。而免疫学方法也存在敏感性低等种种不足。近年来随着分子生物学的发展 ,PCR( 聚合酶链式反应 )方法逐渐应用于弓形虫病的诊断。本研究以 B1 基因某特定片段作为模板建立 PCR 方法 ,检测感染弓形虫的小鼠全血 DNA ,并与 ELISA( 酶联免疫吸

作者简介:李健(1966- )女 ,讲师 ,硕士在读 ,研究方向 病原生物学 ;

李克秋(1967- )女 ,实验师 ,学士 ,研究方向 检验。

附试验)捕获法检测血清 IgM 作比较。此 2 种方法的比较,国内尚未见相关报道,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 昆明种小鼠,体重 20~22 g,雌性,购于天津医科大学实验动物中心。

1.1.2 虫株 弓形虫 RH 株、旋毛虫系本校寄生虫学教研室保种,约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)系首都医科大学寄生虫学教研室赠送。

1.1.3 引物 参照文献<sup>[2]</sup>,由上海 BIOASIA 公司合成。

引物 1 5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3'

引物 2 5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3'

1.1.4 主要试剂 蛋白酶 K(TaKaRa),PCR 试剂盒(10×Buffer,dNTPs,Taq 酶)(TaKaRa),ELISA 试剂盒(北京北方生物技术研究所)

### 1.2 方法

1.2.1 弓形虫 DNA 的制备 复苏、传代冻存的弓形虫速殖子,并以淋巴细胞分离液密度梯度离心法纯化<sup>[3]</sup>,然后将已纯化的弓形虫速殖子( $4 \times 10^7$ /ml)悬浮于 DNA 提取液,37℃ 孵育 1 h,加蛋白酶 K(终浓度 100 μg/ml),50℃ 水浴 1 h,再以常规酚-氯仿法抽提 DNA,最后将 DNA 沉淀溶于 20 μl TE 中,-20℃ 保存。

1.2.2 PCR 扩增和电泳检测 引物 1、2 各 4 μl,10×Buffer 5 μl,模板 DNA 1 μl,dNTPs 4 μl,Taq 酶适量,总体积 50 μl。反应条件:预变性 95℃ 5 min,变性 94℃ 30 s,退火 58℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,35 个循环,最后延伸 72℃ 5 min。扩增结束后,将 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳检测,电压 90 V,时间 20 min,紫外透射仪观察扩增带。

1.2.3 敏感性测试 用紫外分光光度计测定所提取的弓形虫 DNA 的 OD<sub>260</sub>,根据测得的 OD 值计算弓形虫 DNA 的浓度,再进行倍比稀释,分别得到 2 ng、0.2 ng、20 pg、2 pg、0.2 pg、20 fg/μl 等一系列不同浓度 DNA,分别按上述方法检测,以确定其检测阈值。

1.2.4 特异性测试 将弓形虫 RH 株 DNA、约氏疟原虫 DNA、旋毛虫 DNA 以及人血淋巴细胞 DNA 和小鼠血淋巴细胞 DNA 在同样条件下进行 PCR 检测,以确定是否有交叉反应。

1.2.5 感染动物全血和血清标本的采集 随机选取昆明种小鼠 21 只,其中 6 只作为阴性对照组,15 只作为 10<sup>4</sup> 实验组。每只小鼠腹腔接种 10<sup>4</sup> 个弓形虫速

殖子。从感染后的第 2 d(接种当天为第 1 d)开始连续 5 d,每天随机选取实验组 3 只小鼠,每鼠眶静脉采血分成 2 部分,其中 0.5 ml 含 0.1 ml 柠檬酸葡萄糖溶液(ACD),混匀后,-20℃ 冻存以备 PCR 用;另外 0.5 ml 分离血清,-20℃ 冻存,以备 ELISA 使用。

1.2.6 血液模板 DNA 的制备<sup>[4]</sup> 血标本—取抗凝血 0.2 ml,加入 1 ml 0.83% NH<sub>4</sub>Cl,混匀,冰浴 15 min,6 000 rpm 离心 5 min,弃上清,再加入 1 ml 0.83% NH<sub>4</sub>Cl,重复以上操作 5 次,最后向沉淀中加入裂解液 50 μl(1% Triton-X-100,50 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>),95℃ 15 min,离心取上清作为 PCR 的模板。

1.2.7 标本检测 全血标本用 PCR 检测,血清标本用 ELISA 试剂盒检测 IgM。

1.2.8 数据处理 将 PCR 结果和 ELISA 结果以<sup>2</sup>检验进行统计分析。

## 2 结果

2.1 敏感性测定 结果见图 1。结果显示本实验的检测阈值为 0.2 pg 弓形虫 DNA。

2.2 特异性测定 结果见图 2,表明用于检测弓形虫 DNA 的 PCR-ELISA 法对人、小鼠、疟原虫、旋毛虫等 DNA 均无交叉反应。

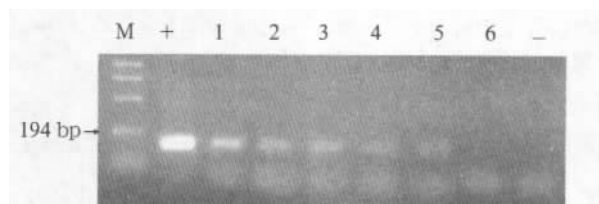


图 1 敏感性测定结果

M: Marker; +: 阳性对照; 1-6: 2 ng, 0.2 ng, 20 pg, 2 pg, 0.2 pg, 20 fg; -: 阴性对照

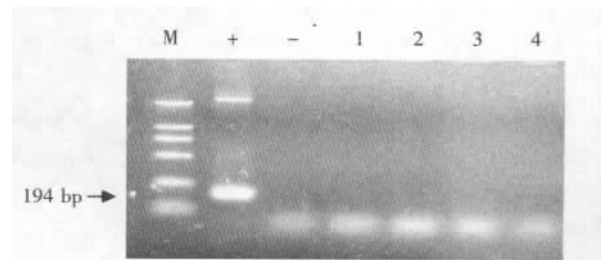


图 2 特异性测定结果

阳性对照: 纯化弓形虫 DNA; 阴性对照: 正常小鼠腹水淋巴细胞 DNA; 1: 正常小鼠血淋巴细胞 DNA; 2: 正常人血淋巴细胞 DNA; 3: 疟原虫 DNA; 4: 旋毛虫 DNA

2.3 感染小鼠全血 DNA 与血清 IgM 检测结果 结果见表 1。全血标本 DNA 检出的总阳性数为 13(13/15), 血清标本 IgM 检出的总阳性数为 2(2/15)。经<sup>2</sup>

检验,PCR法检测全血DNA和ELISA法检测血清IgM的阳性检出效率存在统计学差异( $P<0.05$ )。

表1 10<sup>4</sup>组感染小鼠全血及血清样本检测结果

感染时间 (d)	小鼠数 (n)	阳性小鼠数(n)	
		全血	血清
2	3	1	0
3	3	3	0
4	3	3	0
5	3	3	0
6	3	3	2

### 3 讨论

本实验室所建立的PCR方法,其检测阈值达0.2 pg弓形虫DNA,显示出较高的敏感性。该方法高度的敏感性主要源于扩增基因的拷贝数。本研究选取弓形虫B1基因中的一个194 bp片段作为扩增模板,B1基因属于多拷贝基因,即基因中有高度重复序列,这使其非常适于作PCR的靶基因,从而提高PCR的敏感性。其他学者以该基因进行PCR扩增也获得了较高的敏感性<sup>[6]</sup>,表明以B1基因中的194 bp片段作为扩增模板的PCR法可以作为敏感的弓形虫检测方法。而且,特异性检测结果表明以该片段作为扩增模板,与人、小鼠、疟原虫、旋毛虫等DNA均无交叉反应,显示出良好的特异性。

本实验未采用常规的酚-氯仿法抽提DNA,而是采用低渗溶血后用TritonX-100裂解液直接裂解法获取DNA。采用酚-氯仿法抽提的DNA虽然纯度较高,但提取过程中DNA损失较大,从而影响检测

的灵敏度。直接裂解法则避免了对DNA的抽提过程,溶血后直接以裂解液作为PCR模板,这样得到的DNA虽不是很纯,但并不影响实验结果,同时还减少DNA的损失,进一步提高检测灵敏度。另外,与传统方法相比,更加简便、快速。

弓形虫感染机体后可以通过血液循环进入其他组织,因此可以全血标本来检测弓形虫DNA。IgM是弓形虫感染后在血液中最早出现的抗体,检测IgM可以辅助弓形虫病的诊断。本研究将PCR检测全血DNA与ELISA检测血清IgM进行比较,结果表明,无论是阳性的最早检出时间,还是阳性总检出数,PCR法均明显优于ELISA法,提示本研究建立的PCR法可适用于弓形虫病的早期诊断。

参考文献:

- [1] Martinez E, Carmelo R, Alonso A, et al. Development of a rapid polymerase chain reaction-ELISA assay using polystyrene beads for the detection of toxoplasma gondii DNA [J]. Letters in Appl Microbiol, 2003, 36: 30
- [2] Burg JL, Grover CM, Pouletty P, et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, Toxoplasma gondii, by polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(8): 1 787
- [3] 刘佩梅,吴增强,武苏平.弓形虫速殖子纯化方法的比较[J].天津医科大学学报,1996,2(1):59
- [4] 陈玲,侯敏,褚宏亮,等.弓形虫病的基因诊断研究[J].南京医科大学学报,2003,23(5):437
- [5] 甘伯绍,佟玉品,尹清源.聚合酶链反应检测弓形虫的实验研究[J].中国人兽共患病杂志,1999,15(2):27

(2005-11-07收稿)

(上接第26页)

参考文献:

- [1] O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. Cell, 1997, 88: 277
- [2] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication [J]. N Engl J Med, 1971, 225: 1 182
- [3] Zimmern PE, Laub D, Leach GE. Fluorescein angiography of the bladder: technique and relevance to bladder cancer and interstitial cystitis patients [J]. J Urol, 1995, 154: 62
- [4] B1ezinger P, Wang J, Condo M, et al. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastasis by intramuscular administration of the endostatin gene [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 343

- [5] Ponnazhagan S, Curiel DT, Shaw DR, et al. Adeno-associated Virus for Cancer Gene Therapy [J]. Cancer Res, 2001, 61(17): 6 313
- [6] O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, et al. Two mechanisms of basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in bladder cancer [J]. Cancer Res, 1997, 57(1): 136
- [7] Noro T, Miyake K, Suzuki-Miyake N, et al. Adeno-associated viral vector-mediated expression of endostatin inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic pancreatic cancer model in hamsters [J]. Cancer Res, 2004, 64(20): 7 486

(2005-09-09收稿)