

# 弩巴贝斯虫 PCR 检测方法的建立及应用

薛书江, 于龙政, 曹世诺, 张守发\*

(延边大学 农学院动物医学系, 吉林 龙井 133400)

**摘要:** 根据弩巴贝斯虫 BC-48 基因序列, 设计并合成 1 对特异性引物, 建立了弩巴贝斯虫 PCR 检测方法。试验扩增出 610bp 的基因片段, 其序列与 GenBank 上弩巴贝斯虫 BC-48 基因同源性为 96.7%。而对新孢子虫、弓形虫、马巴贝斯虫的基因组 DNA 没有扩增带出现。对弩巴贝斯虫基因组 DNA 的最小检测量为 2.812 fg/μL。通过对 35 份临床样品的检测, 阳性率为 20%。同时与血液涂片染色镜检进行了比较, 结果表明, PCR 检测方法准确、敏感、特异。

**关键词:** 弩巴贝斯虫; BC-48 基因; PCR

中图分类号: S852.72<sup>+</sup>3 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2007)04-0106-04

## Establishment of A PCR Assay Detecting *Babesia caballi*

XUE Shu jiang, YU Long zheng, CAO Shi nuo, ZHANG Shou fa\*

(Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, China)

**Abstract:** One pair of specific primers was designed based on the BC-48 gene sequence of *Babesia caballi*, and then a PCR assay was established for detecting *Babesia caballi*. A 610bp sequence was amplified by PCR, and the homology with the sequence from GenBank was 96.7%. No PCR products were amplified from purified DNA of *Sporozoan tachyzoites*, *Toxoplasma tachyzoites* and *Theileria sergenti*. This method can detect less than 2.812 fg/μL of the genome DNA of *Babesia caballi*. Using this method, the 35 blood samples were successfully detected and the positive rate was 20%. The results compared with staining method showed that the PCR method was precise, sensitive and specific.

**Key words:** *Babesia caballi*; BC-48 gene; PCR

弩巴贝斯虫病是由弩巴贝斯虫(*Babesia caballi*)经媒介传播, 寄生于马属动物红细胞内所引起的一种血液原虫病<sup>[1]</sup>。寄生在红细胞体内的弩巴贝斯虫及其产生的毒素能导致组织脏器损伤、功能障碍, 从而引起高热、贫血、黄疸、出血和呼吸困难等症状<sup>[2]</sup>。我国将该病列为马二类疫病, 如果诊治不及时, 其死亡率极高, 给广大养马农户造成巨大经济损失<sup>[3]</sup>。目前, 国内外常用的诊断方法有补体结合试验和酶联免疫吸附试验等, 但这些方法存在诊断抗原有限和诊断准确率不高的缺点<sup>[4]</sup>。PCR 诊断技术是 20 世纪 90 年代兴起的一项分子生物学诊断技术, 已在疫病预防和控制等领域得到广泛应用。而

国内尚未见有应用 PCR 技术诊断该病的报道。本研究根据弩巴贝斯虫 BC-48 基因序列, 设计了 1 对特异性引物, 建立了 PCR 检测方法; 并对延边某地区的 35 份马抗凝血进行检测。旨在为今后弩巴贝斯虫病的诊断和防制奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 病料来源

吉林省延边地区散养的马匹, 无菌采取抗凝血, 用 PBS 洗 3 次。存于 80℃ 备用。同时制作了血液涂片, 甲醇固定保存, 供染色镜检。新孢子虫、弓形虫由日本带广原虫病研究所惠赠, 延边大学预防兽

收稿日期: 2007-01-18

作者简介: 薛书江(1982), 男, 吉林东丰人, 在读硕士研究生, 研究方向: 寄生虫分子生物学。

通讯作者: 张守发(1954), 男, 吉林延吉人, 教授, 主要从事家畜寄生虫病学研究。

医实验室保种。马巴贝斯虫基因组 DNA，由延边大学预防兽医实验室提取。

1.2 主要试剂

pGEM - T easy 载体购自 Promega 公司。Tris 饱和酚、氯仿、溶菌酶、蛋白酶 K、大肠埃希氏菌 JM109, *Pst* I, Taq DNA 聚合酶, dNTP, Agarose Gel DNA Extraction Kit, DNA Marker 等, 均购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 PCR 检测方法的建立

1.3.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 上登录的弩巴贝斯虫 BC - 48 基因序列 (U46551), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计了 1 对引物。上游引物 P1: 5' - GGC TCC CAG CGA CTC TGT GG - 3', 下游引物 P2: 5' - CTT AAG TGC CCT CTT GAT GC - 3'。引物由上海英骏生物技术公司合成。

1.3.2 弩巴贝斯虫 DNA 标准模板的制备 将临床表现发热、贫血、黄疸和水肿, 经血液涂片染色镜检弩巴贝斯虫均为阳性的病马抗凝血, 从 80℃取出, 取 150μL 加入 15μL 溶菌酶 (100mg/mL), 37℃水浴 1h; 然后加入 9μL 蛋白酶 K (10mg/mL), 5mol/L NaCl 105μL, 5%CTAB 240μL, 65℃水浴 10min; 取出后加等体积 Tris 饱和酚和氯仿抽提; 最后将抽提的 DNA 用 20μL TER 溶解。 - 20℃保存, 经鉴定克隆判断无误后, 用紫外分光光度仪测 DNA 的含量。

1.3.3 PCR 扩增及退火温度的筛选 PCR 反应在 15μL 体系中进行: 10× buffer 1.5μL, dNTP 1.5μL, Taq DNA Polymeras 0.15μL, 引物各 1μL (10pmol/L), DNA 模板 1μL。扩增程序为: 96℃预变性 5min, 94℃变性 1min, 56~61℃退火 1min, 72℃延伸 1min, 进行 35 个循环, 最后于 72℃延伸 7min。56~61℃的梯度温度分别是 56℃, 57℃, 58℃, 59℃, 60℃和 61℃。选择特异性强、产量高的梯度温度作为以后 PCR 反应的退火温度。

1.3.4 PCR 产物的克隆与鉴定 用 Agarose Gel DNA Purification Kit 回收与纯化 PCR 产物。将纯化的 PCR 的产物与 pGEM - T easy 载体按常规方法连接, 转化至感受态大肠埃希氏菌 JM109。经蓝白斑筛选, 挑取白色单菌落接种于含氨苄青霉素 (100μg/mL) 的 LB 培养液中, 37℃剧烈振摇培养 12h; 按碱裂解法提取质粒。重组质粒经 PCR 鉴定和 *Pst*I 单酶切鉴定。将鉴定为阳性的克隆送至上海英骏生物技术有限公司测序。

1.3.5 特异性试验 以弩巴贝斯虫基因组 DNA 为试验样本, 以新孢子虫、弓形虫、马巴贝斯虫基因组 DNA 为对照样本, 按照最佳退火温度进行 PCR 反应, 经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

1.3.6 敏感性试验 将弩巴贝斯虫标准品 DNA 以 10 倍为梯度连续稀释成 6 个不同浓度。按照上述 PCR 反应体系, 使用最适退火温度进行 PCR 扩增, 确定 PCR 反应体系的敏感性。

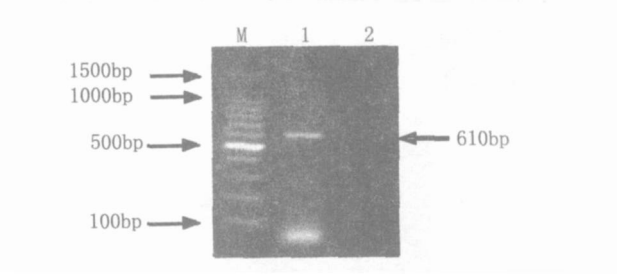
1.4 临床样本的检测试验

应用所建立的 PCR 方法对采自吉林省延边地区的 35 份血液样品进行检测, 并且与血液涂片染色镜检进行比较。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

以提取的弩巴贝斯虫基因组 DNA 为模板, P1, P2 为引物进行 PCR 扩增。经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得了 1 条约 610bp 的特异性 DNA 条带 (图 1), 与预期的片断大小相一致。

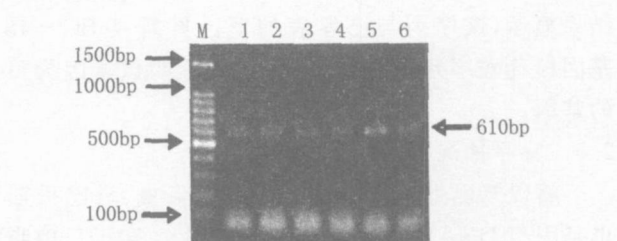


M: 100bp DNA 分子质量标准; 1: 弩巴贝斯虫 DNA 样本; 2: 空白对照

图 1 BC - 48 基因的 PCR 扩增

2.2 退火温度的筛选

退火温度在 56~61℃之间时, PCR 均能扩增出目的产物。退火温度为 60℃时, 目的产物最亮, 条带单一 (图 2)。因此, 本研究选择 60℃作为最适退火温度。

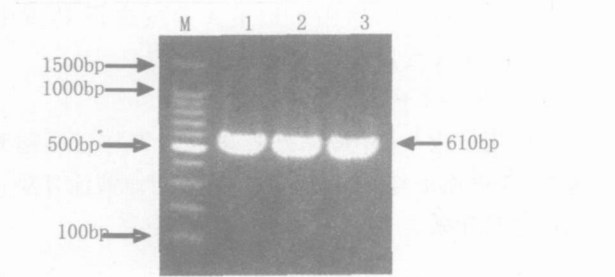


M: 100bp DNA 分子质量标准; 1~6: 退火温度分别为 56℃, 57℃, 58℃, 59℃, 60℃, 61℃时的 PCR 产物

图 2 PCR 退火温度的筛选

2.3 目的基因的鉴定

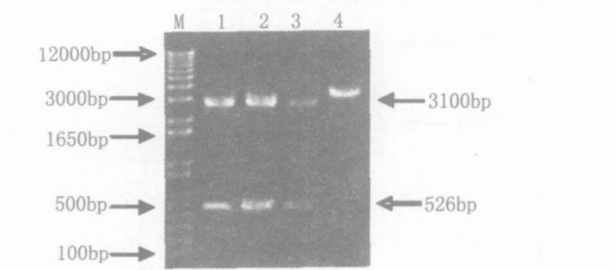
2.3.1 目的基因的 PCR 鉴定 以初步筛选为阳性的重组克隆质粒为模板进行 PCR 扩增, 10g /L 琼脂糖凝胶电泳。结果显示, 扩增出的 DNA 片段大小与 BC - 48 基因片段大小一致(图 3)。说明重组质粒含有目的基因。



M: 100bp DNA 分子质量标准; 1~3: PCR 扩增产物

图 3 pGEM- BC48 质粒的 PCR 鉴定

2.3.2 目的基因的酶切鉴定 用 *Pst* I 对初步鉴定为阳性的重组克隆质粒进行酶切鉴定, 酶切产物于 10g /L 琼脂糖凝胶中电泳。结果显示, 经 *Pst* I 酶切, 得到了 3100bp 和 526bp 的 2 条特异性片段(图 4), 说明重组质粒含有目的基因, 并且该基因正向插入载体内。



M: 1kb DNA 分子质量标准; 1~3: *Pst* I 酶切产物; 4: 阴性对照

图 4 pGEM- BC48 重组质粒的酶切鉴定

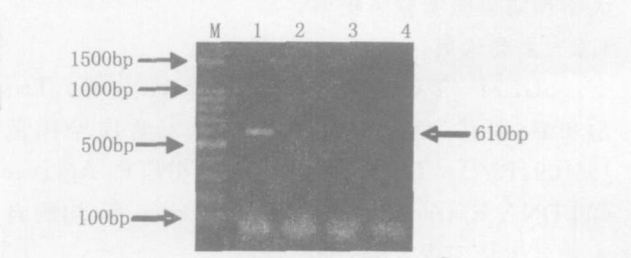
2.4 同源性分析

测序结果表明, 克隆得到的鬃巴贝斯虫 BC - 48 基因片段大小为 610bp。DNASIS v2.5 Demo 分析结果显示, 该序列与已发表的鬃巴贝斯虫 BC - 48 基因核苷酸序列同源性为 96.7%, 证明该基因为目的基因。

2.5 特异性试验

将以鬃巴贝斯虫、新孢子虫、弓形虫、马巴贝斯虫基因组 DNA 为模板的 PCR 产物, 经 10g /L 琼脂糖凝胶电泳分析。电泳结果显示, 仅鬃巴贝斯虫 DNA 样本扩增出约 610bp 大小的片段, 而作为对照样本的新孢子虫、弓形虫、马巴贝斯虫基因组

DNA 均无此扩增条带出现(图 5)。

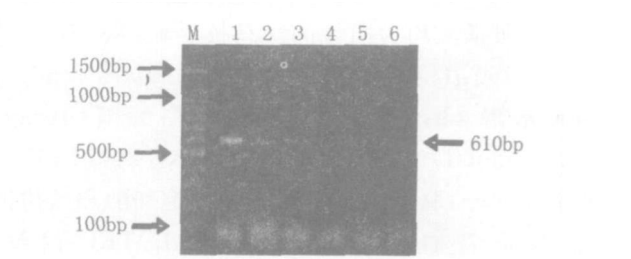


M: 100bp DNA 分子质量标准; 1: 鬃巴贝斯虫模板 DNA;  
2: 新孢子虫; 3: 弓形虫; 4: 马巴贝斯虫

图 5 PCR 特异性试验结果

2.6 敏感性试验

经分光光度计测得提取的基因组 DNA 浓度为 2.812 ng / $\mu$ L。对 6 个浓度梯度的鬃巴贝斯虫 DNA 标准模板进行 PCR 反应, 电泳分析结果表明, 当样本中鬃巴贝斯虫 DNA 含量大于 2.812fg / $\mu$ L 时, 即可扩增产生清晰可辨的条带(图 6)。DNA 稀释  $10^5$  倍为检测的最低界限。



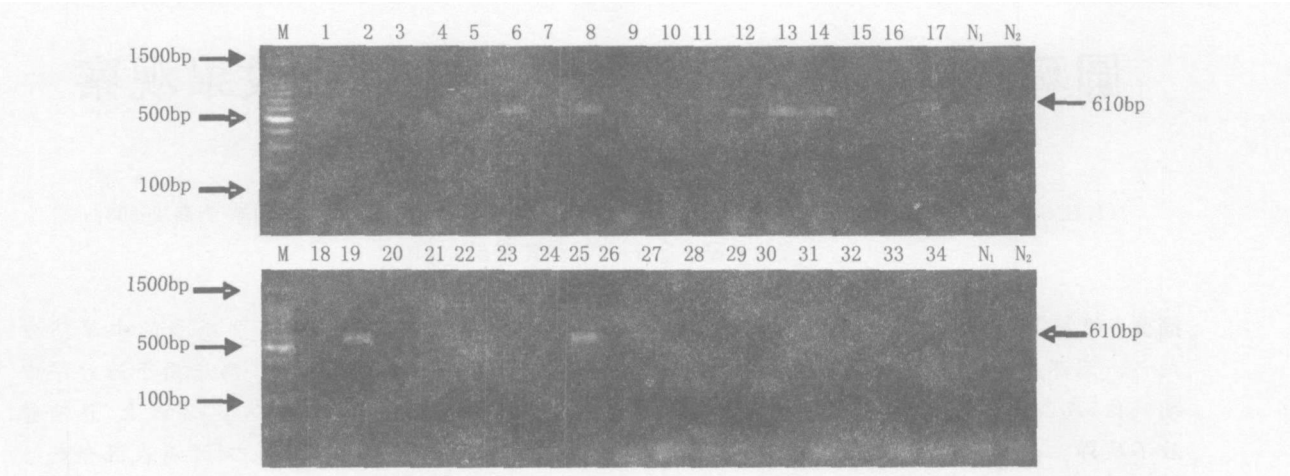
M: 100bp DNA 分子质量标准; 1: 2.812ng / $\mu$ L DNA; 2: 281.2  
pg / $\mu$ L DNA; 3: 28.12pg / $\mu$ L DNA; 4: 2.812pg / $\mu$ L DNA;  
5: 281.2fg / $\mu$ L DNA; 6: 28.12fg / $\mu$ L DNA

图 6 PCR 敏感性试验结果

2.7 临床样本检测

2.7.1 临床样本的 PCR 检测 应用所建立的 PCR 方法对 35 份马血液样本进行检测。结果显示, 其中 6 号、8 号、12 号、13 号、14 号、19 号、25 号均扩增出了大小为 610bp 的特异性基因片段(图 7)。说明该 7 匹马感染了鬃巴贝斯虫, 阳性检出率为 20%(7/35)。

2.7.2 血液涂片染色镜检与 PCR 检测的比较 按常规方法对血液涂片进行姬姆萨染色后, 用显微镜对 35 份马血液样本进行检测, 与 PCR 检测结果进行比较。PCR 方法阳性检出率为 20%(7/35), 涂片染色镜检法阳性检出率为 5.71%(2/35)。可见, 用 PCR 方法检测鬃巴贝斯虫的阳性率是血液涂片镜检方法的 3.5 倍。而且其中涂片镜检出的 2 份阳性血液样本, PCR 检测均为阳性; 有 5 份涂片镜检阴性的血液样本 PCR 检测也呈阳性反应。表明 PCR 检测



M: 100bp DNA 分子质量标准; 1~35: 被检抗凝血液样本; N1: 健康马血液样本; N2: 空白对照

图 7 35 份马血液样本 PCR 结果

方法更加敏感、准确。

3 结论与讨论

鉴于目前国内对该病的分子生物学及基因方面报道甚少。试验根据驢巴贝斯虫编码棒状蛋白的 BC-48 基因序列设计了 2 条特异性引物, PCR 扩增出约 610bp 的基因片段。因为 pGEM-T easy 载体为 3015bp, 目的片断为 610bp; 而目的基因的 172bp 处和载体上各有一个 PstI 酶切位点。所以, 经 PstI 酶切后, 正连应切为 3100bp 和 526bp, 反连为 3365bp 和 261bp。酶切结果显示, 质粒被切成了 3100bp 和 526bp 2 个片断。PCR 鉴定结果, 扩增出了 610bp 片断, 与预期结果一致。测序结果显示, 克隆的片断序列与已发表的驢巴贝斯虫 BC-48 基因核苷酸序列同源率为 96.7%。表明该段基因为目的基因, 从而成功的克隆了 BC-48 基因, 为 DNA 序列分析和基因表达等研究提供了物质材料。在此基础上, 试验建立了驢巴贝斯虫 PCR 检测方法。试验表明该方法准确、特异、敏感, 为流行病学调查、有效控制该病奠定了技术基础。

对于驢巴贝斯虫病的诊断, 我们认为血清学方法存在许多弊端。这是由该病的发病特点决定的。主要表现在以下几个方面: 第一, 该病属于完全免疫性疾病。马匹感染虫体后, 机体产生抗体, 将体内的虫体杀灭。此时马匹体内依然存在着抗体, 因此血清学检测会出现阳性结果; 而此时马体内已不存在虫体, 造成检测结果偏高。第二, 当大批量检测时, 血清学方法需大量的抗原, 然而驢巴贝斯虫的虫血症在马中很少见。加之从感染驢巴贝斯虫的红血球

中提取抗原是比较困难的, 抗原来源少。因此血清学方法在推广中必然会受到限制。第三, 据报道, 利用溶解感染驢巴贝斯虫的红血球作为抗原进行血清学诊断, 会引起驢巴贝斯虫和马巴贝斯虫的交叉反应<sup>[5,6]</sup>, 势必会造成假阳性的检测结果。而针对病原体进行检测的 PCR 方法会避开以上的弊端, 而且检测快速、准确、敏感、特异。与血清学相比较, PCR 检测方法将会有更广阔的应用前景。

参考文献:

[1] 李跃增. 甘肃省驢巴贝斯虫流行情况与防治对策[ J ]. 中国兽医寄生虫病, 2006, 14( 1 ): 47-50.

[2] 李朝君, 刘际彬. 马梨形虫病血清学诊断技术研究[ J ]. 中国动物检疫, 1997, 14( 3 ): 25-26.

[3] 赵桂英, 于富贵, 丁秀文. 马驢巴贝斯虫病的诊治[ J ]. 吉林畜牧兽医, 2000, 4( 1 ): 28-30.

[4] Hiromi Ikada, Xuenan Xuan, Ikou Igarashi. Cloning and expression of a 48 Kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme linked immunosorbent assay[ J ]. American Society for Microbiology, 1999, 37( 11 ): 3475-3480.

[5] Bose R, B Peymann. Diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses by enzyme linked immunosorbent assay ( ELISA ) and western blot[ J ]. Int J Parasitol, 1994, 24: 341-346.

[6] Weiland G. Species specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test, immunofluorescence, and enzyme linked immunosorbent assay[ J ]. Vet Parasitol, 1986, 20: 43-48.