

# 炭疽芽胞杆菌染色体特异序列的筛选及实时定量检测

荣光华<sup>1</sup> 夏 懿<sup>2</sup> 朱诗应<sup>1</sup> 童一民<sup>1</sup> 戚中田<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 第二军医大学微生物学教研室 全军医学微生物学重点实验室 上海 200433)

(<sup>2</sup> 复星医学科技发展有限公司 上海 200233)

**摘 要** 筛选 117 条炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)特异序列,经双重特异性验证后得到 19 条理想的特异序列(genomic signatures),其中 6 条符合设计 TaqMan 探针建立实时定量 PCR 的要求,根据常规 PCR 检测结果选择其中 C04 片段与炭疽芽胞杆菌毒性质粒 pX01、pX02 上的 *pagA*、*capB* 基因建立实时定量 PCR 检测体系。经试验证实这一体系检测灵敏度达到每 PCR 反应 10~100 个拷贝。利用 12 种相关菌株评价后获得 100% 特异性,对 10 份模拟污染标本和 20 份对照标本检测,所有污染标本均被检出,所有对照标本均为阴性。此方法特异、灵敏、高效,在炭疽芽胞杆菌感染的诊断和环境污染的检测等领域有潜在的应用前景。

**关键词**: 炭疽芽胞杆菌; 染色体特异序列; 实时定量检测; PCR

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)06-0900-06

炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)是引起人类及动物烈性传染病——炭疽的病原体,由于其致命的致病力和炭疽芽胞对自然环境强大的抵抗力,炭疽一直是世界上研究最多分布最广的生物战剂。早期快速特异地检测空气、土壤、水源以及可疑标本中的炭疽芽胞杆菌有助于降低感染人群死亡率、切断传染源、阻断病原更大规模扩散等,具有非常重要的意义。

炭疽芽胞杆菌与自然界中广泛分布的腊样芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌同属于腊样芽胞杆菌群,在核酸水平,它们之间最大的区别是炭疽芽胞杆菌携带两个毒性质粒 pX01 和 pX02<sup>[1]</sup>,但是质粒并不稳定,容易缺失、转移和突变<sup>[2]</sup>,因此,在相对保守染色体上寻找针对炭疽芽胞杆菌的特异序列,利用这些炭疽芽胞杆菌基因组独有的特异序列(genomic signatures)作为检测靶点建立荧光定量 PCR 检测方法,既可以提高检测特异性又可以克服以往大部分仅依靠毒性质粒 pX01 和 pX02 检测方法的局限性。尽管已有文献报道了相关染色体特异检测序列,但后续研究相继证实这些序列的检测灵敏度、特异性以及速度不够理想<sup>[2~9]</sup>。为了得到新的炭疽芽胞杆菌染色体特异检测序列,本研究从 117 条<sup>[10~12]</sup>炭疽芽胞杆菌染色体特异序列中筛选出 6 条最优序列,设计 TaqMan 探针和引物,最终建立了一种快速、准确、特异定量检测炭疽芽胞杆菌的新方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株**:炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、伤寒沙门菌(*Eberthus typhosus*)、变形杆菌(*Bacillus proteus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)、铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由本实验室保存,炭疽芽胞杆菌疫苗株购自上海市畜牧兽医站,腊样芽胞杆菌(*Bacillus cereus* GIM1.4)、苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis* GIM1.126)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* GIM1.129)、多粘芽胞杆菌(*Bacillus polymyxa* GIM1.89)、短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus* GIM1.18)、巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium* GIM1.13)、蕈样芽胞杆菌(*Bacillus mycoides* GIM1.113)购自广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心(GIM 编号),所有菌株均经培养鉴定。

**1.1.2 主要试剂和仪器**:Taq DNA 聚合酶(大连宝生物公司)、荧光定量 PCR 试剂盒(上海复星医学诊断公司)、小量质粒提取试剂盒、A/T 克隆试剂盒(上海 Sangon 公司)、细菌基因组抽提试剂盒(加拿大 Bio-Basic 公司);ABI5700 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)、iCycler 荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)、LightCycler 荧光定量 PCR 仪(瑞士 ROCHE 公

基金项目:军队十一五医药卫生专项项目(06Z026);第二军医大学军事医学专项(05JS01)

\* 通讯作者。Tel: 86-21-25070312; E-mail: qizt@smmu.edu.cn

作者简介:荣光华(1980-)男,山东人,硕士研究生,主要从事微生物检测研究。E-mail: shengfandayeren@126.com

收稿日期:2006-01-20;接受日期:2006-04-06;修回日期:2006-06-24

司) SLAN 荧光定量 PCR 仪(深圳匹基公司) FR200 紫外分析仪(上海复日公司)。

## 1.2 基因组 DNA 制备

所有涉及炭疽芽胞杆菌的操作均在生物安全实验室及生物安全柜内进行。

**1.2.1 方法 A:** 炭疽芽胞杆菌悬液沸煮 20min, 4500r/min 离心 15min, 收集上清作为粗提标本。

**1.2.2 方法 B:** 炭疽芽胞杆菌悬液 10000r/min 离心 1min, 沉淀 -20℃ 和 65℃ 反复冻融, 加入 10mL TE (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA pH8.0) 缓冲液重悬, 利用 Patra<sup>[4]</sup>报道的方法抽提基因组 DNA, 得到的基因组 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外定量后 -20℃ 冻存。

**1.2.3 方法 C:** 炭疽芽胞杆菌及试验中其它菌株按 Bio-Basic 细菌基因组抽提试剂盒说明书抽提基因组 DNA, 鉴定及定量方法同前。

## 1.3 模拟污染标本的制备

**1.3.1 模拟污染土壤:** 土壤标本随机取自第二军医大学校园, 分别加入系列稀释的炭疽芽胞杆菌悬液, 振荡混匀后 4℃ 过夜。土壤标本中 DNA 抽提方法参考文献 [13] 的方法进行。

**1.3.2 模拟污染生活用水:** 生活用水标本取自本实验室, 分别加入系列稀释炭疽芽胞杆菌悬液, 沸煮 20min, 10000r/min 离心 10min, 取上清作为 PCR 模板。

## 1.4 染色体特异性序列的筛选及引物、探针的设计和合成

选取候选的炭疽芽胞杆菌染色体特异序列共 117 段<sup>[10-12]</sup>进行两次筛选。首先利用 NCBI BLAST-tn 比对所有候选序列, 筛选出完全符合 GenBank 数据库中炭疽芽胞杆菌基因组数据的候选序列。序列入选条件: 与 GenBank 中炭疽芽胞杆菌基因组具 100% 同源性 (BLAST E-value = 0); 与其它物种尤其是炭疽芽胞杆菌近源菌种不具有或仅具极低同源性 (BLAST E-value  $\geq 0.1$ ), 符合条件的序列可认为具有较理想的理论特异性。其次, 为了得到适合 TaqMan 实时定量 PCR 检测方法目标序列, 在满足特异性的基础上还必须根据 TaqMan 复合探针和引物的设计原则, 对这些序列进行二次筛选。由于第一次筛选中得到的部分特异片段长度较短 (小于 200bp), 难以同时找出理想的引物对和探针, 根据 GenBank 中炭疽芽胞杆菌全基因组序列向其 3' 和 5' 端各延伸 200bp 得到 600bp 左右的加长序列 (expanded sequence), 并再次利用第一步的筛选方法和入选条

件验证这些加长序列的特异性。经两次筛选后得到 6 段既满足炭疽芽胞杆菌特异性又符合 TaqMan 探针和引物设计原则的特异序列 (C01、C03、C04、C06) 或加长序列 (C02、C05)。利用 Oligo 6.0 软件人工设计 6 条序列及 *pagA* 基因、*capB* 基因的 TaqMan 探针和引物, 所有探针、引物及理论扩增片段序列再经 BLAST-tn 验证具 100% 特异性之后交由上海生工生物工程技术服务公司合成。

## 1.5 常规 PCR 及多重 PCR

为了验证新设计引物的特异性, 从 6 套引物探针中选择最优方案用于实时定量检测, 将所有 8 对引物 (C01 ~ C06 片段、*pagA*、*capB*) 分别与不同浓度、不同方法抽提的炭疽芽胞杆菌基因组 DNA 及其它近源菌株基因组 DNA 进行常规 PCR 反应, 经多轮反应优化条件后选定特异性较好, 扩增效果稳定的 C04 片段用于定量 PCR 检测方法, 在常规 PCR 基础上尝试建立基于 C04 片段与 *capB*、*pagA* 基因的多重 PCR 检测体系, 并且最终得到 C04 片段与 *capB* 基因的双重 PCR 检测体系。常规 PCR 反应体系: 50 $\mu$ L 反应总体积包括 5 $\mu$ L 10 $\times$  PCR 缓冲液; 5 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L); 0.3 $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ L); 1 $\mu$ L dNTP (10mmol/L); 正、反向引物 (10 $\mu$ mol/L) 各 2 $\mu$ L, 2 $\mu$ L DNA 模板。反应条件: 95℃ 5min, 94℃ 30s, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 32 个循环; 72℃ 延伸 10min。双重 PCR 反应体系: 50 $\mu$ L 反应总体积包括 5 $\mu$ L 10 $\times$  PCR 缓冲液; 8 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L); 0.5 $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ L); 1 $\mu$ L dNTP (10mmol/L); C04 正、反向引物 (10 $\mu$ mol/L) 各 2 $\mu$ L, *capB* 正、反向引物 (10 $\mu$ mol/L) 各 1 $\mu$ L, 2 $\mu$ L 检测模板。反应条件: 95℃ 5min, 94℃ 30s, 60℃ 45s, 72℃ 45s, 32 个循环; 72℃ 延伸 10min, PCR 产物经 4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.6 定量标准制备

将 C04 片段、*pagA* 基因、*capB* 基因 PCR 产物胶回收, 纯化后连接至 PUC1m 载体, 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌, 挑取阳性克隆株分别用 PCR 和抽提质粒双酶切鉴定后测序, 测序完全正确的重组质粒经核酸定量后按拷贝数从 10<sup>6</sup>/ $\mu$ L ~ 10<sup>1</sup>/ $\mu$ L 系列梯度稀释, -20℃ 备用。

## 1.7 实时定量 PCR

选择 C04 片段、*pagA* 基因、*capB* 基因作为实时定量 PCR 反应的检测靶位点, 反应总体积 25 $\mu$ L 包括 5 $\mu$ L 5 $\times$  定量 PCR 缓冲液 (含 UNG 酶) 4 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L), 0.5 $\mu$ L dNTP (终浓度均为 10mmol/L), 1 $\mu$ L 正、反向引物 (10 $\mu$ mol/L), 0.6 $\mu$ L 荧光探针

(10 μmol/L), 1.5 μL 荧光 Taq 聚合酶 (1U/μL), 分别取 1 μL 梯度稀释的标准质粒作为模板。反应条件: 55°C 2min, 95°C 2min, 95°C 20s, 60°C 1min, 共 45 个循环。

## 2 结果

### 2.1 炭疽芽胞杆菌染色体特异序列筛选结果

第一轮筛选从 117 条候选序列中得到了 11 条具有 100% 同源性和 8 条具有 99% 以上同源性的炭疽芽胞杆菌基因组特异序列(数据未列出), 第二轮筛选从 11 条 100% 特异序列中筛选出 6 条(表 1)设计 TaqMan 探针和引物, 引物及探针序列如表 2

表 2 引物和探针序表

Table 2 Primers and probes for PCR and real-time PCR of *Bacillus anthracis*

Target fragment	Primer and probe sequences (5' ~ 3')	PCR product/bp	Description
C01	S : CGACATGGATACGTTGTTCAA A : ATCGTATGACAACCTTCCCACC P : CACCCGACGCCATTCCITCAGC	165	<sup>a</sup> Primers only
C02	S : CACAACCTTGATTGCTTAAGAGA A : TTCTAATTCTGCTCTATGCGAT P : ACGCTCGCTTAATGCTGTGTTGC	151	<sup>b</sup> Primers only with expanded sequence
C03	S : TGTCTCATTACGTCACCTCTTT A : TCTTCAAATTAGCACCCACCT P : CTTGCTAACCGCTCCGCCCTTG	174	Primers only
C05	S : CGTGCTCTTAACCTCGTCCCAT A : TTACCCAACATCATCTTGGCA P : TCGCTTTCATCGCATTTCTGCC	254	Primers only with expanded sequence
C06	S : CTTTACCACATCTGTTTCT A : AAAGATTCAAAGAGGAGATATAA P : AGCAAAGATCTGTGGGGAGAAAC	132	Primers only
C04	S : CGTGCTCTTAACCTCGTCCCAT A : TTACCCAACATCATCTTGGCA P : TCGCTTTCATCGCATTTCTGCC	175	Primers and probe used in this research
PagA	S : CGTGCTCTTAACCTCGTCCCAT A : TTACCCAACATCATCTTGGCA P : TCGCTTTCATCGCATTTCTGCC	204	Primers and probe used in this research
CapB	S : TTACATGGTCTTCCCAGATAATGC A : ACATACCACGGAAATGCTGTTTTC P : ATCCCAAGAGCTCTGCTACCGCT	89	Primers and probe used in this research

<sup>a</sup>Primers and probe are designed according to the genomic signatures sequence. Only primers are verified via this research. <sup>b</sup>Primers and probe are designed according to an expanded sequence based on the original genomic signatures sequence. Only primers are verified via this research. <sup>c</sup>Primers and probe are designed according to the genomic signatures sequence and used in this research. S : Sense primer. A : Antisense primer. P : 5' FAM and 3' TAMARA modified TaqMan probe.

### 2.2 常规 PCR、多重 PCR 及实时定量检测靶点的选择

C01 ~ C06 片段、*pagA*、*capB* 基因 8 对引物分别与不同浓度、不同方法抽提的炭疽芽胞杆菌基因组 DNA 及其它近源菌株基因组 DNA 进行常规 PCR 反应, 所有引物均可得到特异性目的扩增条带(数据未列出), 选择特异性较好, 扩增效果稳定的 C04 片段作为定量 PCR 检测靶点, 同时利用 C04 片段与 *capB* 基因建立双重 PCR 体系, 扩增效果如图 1 所示。

所示。

表 1 炭疽芽胞杆菌染色体特异序列

Table 1 *B. anthracis*-specific genomic signatures

Fragment	Length (bp)	Coordinate <sup>a</sup>		Blast E value
		5'	3'	
C01	342	344770	345109	0.0
C02	151	990508	990656	0.0
C03	425	4227290	4227710	0.0
C04	645	186609	185965	0.0
C05	187	2472346	2472532	0.0
C06	242	3485846	3485605	0.0

<sup>a</sup>Sequence positions coordinates on the *Bacillus anthracis* A2012 Genome. The GenBank accession number is NC\_003995.

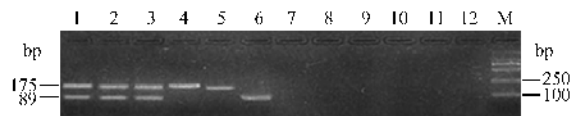


图 1 炭疽芽胞杆菌 C04 片段与 *pagA*、*capB* 基因的常规 PCR 及双重 PCR 结果

Fig. 1 PCR and duplex PCR analysis on fragment C04, *pagA* and *capB* genes of *Bacillus anthracis*. 1 ~ 3. Duplex PCR amplification of fragment C04, *capB* with genomic DNA extracted by method A, method B and method C; 4 ~ 6. PCR amplification of fragment C04, *pagA*, *capB*; 7 ~ 12. PCR amplification of *Bacillus anthracis* closely related species; M. DL2000 marker.

### 2.3 实时定量 PCR 敏感性评价

2.3.1 利用重组质粒评价敏感性: 分别将 C04 片段、*pagA* 基因、*capB* 基因标准质粒按照  $10^6/\mu\text{L} \sim 10^1/\mu\text{L}$  梯度稀释作为模板评价检测体系敏感性, 如图 2 所示 3 套探针引物分别可以检测出每个反应体系中 10、10、100 个目标核酸拷贝。

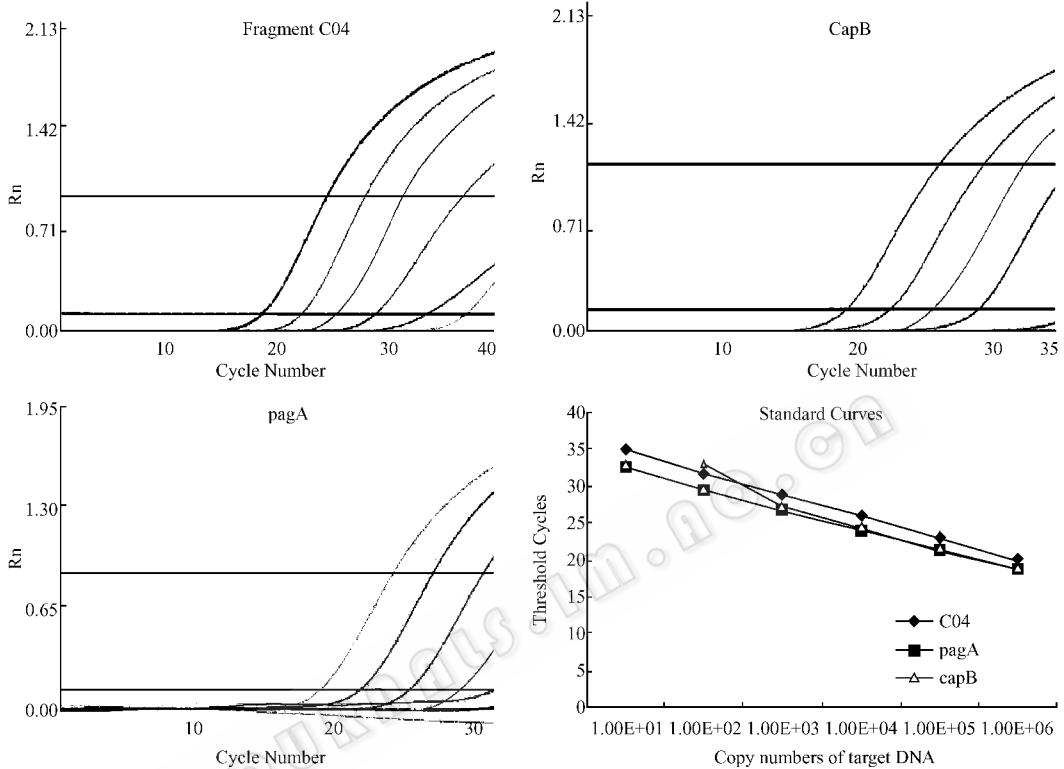


图 2 实时定量 PCR 敏感性评价

Fig.2 Sensitivity of real-time TaqMan PCR for detection of fragment C04 and *pagA* and *capB* genes. Serial dilutions of standard plasmids ranging from  $10^6$  copies per microlite to 10 copies per microlite were run in C04-specific (A), *capB*-specific (B) and *pagA*-specific (C) real-time PCR.

The curves represent fluorescence changes over cycles. The standard curves for the three PCR assays are shown in (D).

### 2.4 实时定量 PCR 特异性评价

分别以炭疽有毒株、疫苗株作为阳性对照, 检测腊样芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌、多粘芽胞杆菌、短小芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌、蕈样芽

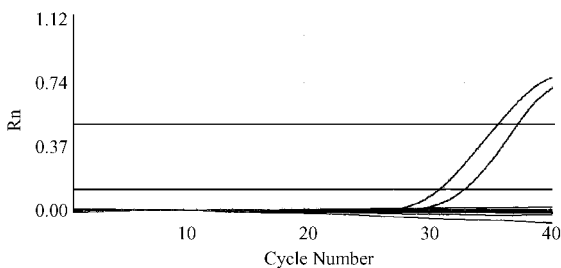


图 3 实时定量 PCR 特异性评价 (C04 片段)

Fig.3 Real-time PCR on *Bacillus anthracis* and related species. All of the none-anthraxis strains show negative signal while *Bacillus anthracis* and *Bacillus anthracis* vaccine strains give strong positive signal.

2.3.2 利用有炭疽芽胞杆菌基因组 DNA 评价敏感性: 将  $0.1\text{mg}/\mu\text{L}$  炭疽芽胞杆菌基因组 DNA 以 10 倍比进行梯度稀释, 分别取  $1\mu\text{L}$  作为模板评价体系敏感性, 本体系最低可检出 100fg 的基因组 DNA, 根据炭疽芽胞杆菌基因组大小及其 GC 含量换算相当于每个反应可检出约 30 拷贝基因组 DNA。

胞杆菌、伤寒沙门杆菌、变形杆菌、大肠杆菌、假结核耶尔森菌、铜绿假单胞杆菌共 12 株, 无一出现非特异性扩增曲线, 初步证实本体系具有较理想的特异性 (图 3)。

### 2.5 模拟污染土壤标本的检测

将 5 份模拟污染的土壤标本和 5 份模拟污染的生活用水标本与经高温灭菌的土壤、生活用水对照标本各 10 份经核酸提取步骤后利用本体系进行检测, 全部 10 份污染标本均被检出, 而对照标本无一出现假阳性结果。

## 3 讨论

检测炭疽芽胞杆菌的方法主要有基于培养和生化鉴定的传统实验室方法、基于抗原抗体结合的免疫学方法和基于基因组特异序列的核酸检测方法。

核酸检测方法特异性强,速度快,技术成熟,标本中的炭疽芽胞杆菌在生物安全实验室中进行核酸释放处理阶段通常被灭活,相对其它检测方法更安全。本研究采用的基于 TaqMan 探针技术的实时定量 PCR 方法检测灵敏度高、结果稳定,引物、探针和模板序列之间的双重特异性克服了传统 PCR 的缺陷,非常合适用作炭疽芽胞杆菌的快速检测。

早期的炭疽芽胞杆菌核酸检测方法主要是采用传统的 PCR-电泳法,选择的靶点多为炭疽杆菌毒性质粒 pX01 和 pX02 上 *pagA*、*lef*、*cya*、*capA*、*capB*、*capC* 等基因<sup>[14,15]</sup>。但是炭疽芽胞杆菌毒性质粒并不稳定,已经证实自然界存在很多毒性质粒缺失的炭疽菌株<sup>[2]</sup>,虽然缺失质粒 pX01 或 pX02 的菌株基本不具备致病性,但已有文献报道成功构建了包含 *pagA* 序列的重组质粒,该重组质粒在大肠杆菌中可以稳定表达重组炭疽杆菌保护性抗原<sup>[16]</sup>,可以想象利用现代分子生物学技术已经完全有可能改变毒性质粒的读码框架,构建与毒性质粒检测靶点序列不同但表达相同炭疽毒素的菌株。综合上述原因,仅检测毒性质粒极易造成假阴性或者假阳性结果,只有将染色体特异靶点和毒性质粒进行复合检测才是真正安全有效的方法。而选择特异性高、敏感性好的染色体检测序列就成为一套检测体系成功与否的关键。炭疽芽胞杆菌与腊样芽胞杆菌属其它细菌之间特殊的基因关系决定了这是一项比较困难的工作。我们认为理想的 TaqMan 方法检测序列应该具备以下条件:(1)与炭疽芽胞杆菌基因组具有 100% 同源性而与近源细菌和其它物种不具有同源性或仅具有极低的同源性。(2)序列具有一定的长度和满足一定条件,可以用于设计探针和引物。2003 年 Ivanova 等<sup>[12]</sup>在大规模测序的基础上分析了炭疽芽胞杆菌 A2012 株部分基因组序列和腊样芽胞杆菌 ATCC14579 株的全基因组序列,认为两者确实存在着差异,Radnedge 等<sup>[10]</sup>利用抑制性消减杂交技术研究了炭疽芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌之间的基因组差异,得到了 93 段炭疽芽胞杆菌特异的核酸序列,并且利用常规 PCR 进行了初步验证;Draghici 等<sup>[11]</sup>利用生物信息学方法发现了 17 段炭疽特异序列,2004 年以来包括炭疽芽胞杆菌在内的一系列属于腊样芽胞杆菌群的菌种相继完成了全基因组测序计划<sup>[18,19]</sup>,使得我们利用 GenBank 强大的数据库功能对这些候选特异序列进行筛选成为可能。

目前国外已报道用于荧光定量 PCR 检测的炭疽芽胞杆菌特异序列主要有 *Ba813*<sup>[4]</sup>、*vrrA*<sup>[5]</sup>、

*gyrB*<sup>[6]</sup>、*gyrA*<sup>[7]</sup>、*Sap*<sup>[8]</sup>、*SG-850*<sup>[9]</sup>、*rpoB*<sup>[2]</sup>等,建立的检测方法主要可以分为两类:一类是基于单个功能基因上一个或几个寡核苷酸突变(如 *rpoB*、*gyrA*)这种方法的配合根据突变位点设计的引物及探针可取得相当理想的检测效果;第二类是利用基因组可变串连重复序列(如 *vrrA*、*SG-850*)这类方法虽具有一定特异性但是 PCR 扩增后还需酶切电泳,相对耗时费力,对电泳结果的判断主观性较大。国内学者也对炭疽芽胞杆菌检测进行了大量的研究,陈苏红<sup>[20]</sup>、李伟等<sup>[21]</sup>以炭疽芽胞杆菌 *rpoB* 基因为染色体检测靶点分别利用复合探针法和 TaqMan 建立了敏感特异的实时定量 PCR 检测方法,取得了理想的检测效果。张玲等<sup>[22]</sup>利用炭疽芽胞杆菌毒性质粒 *cap* 基因和染色体特异 EF 基因建立了基于 SYBR Green I 的实时定量 PCR 检测方法,其灵敏度达到了每反应体系 0.53pg。相比国内外已建立的检测方法,本研究主要目的在于筛选新的炭疽芽胞杆菌特异序列,并通过实验对筛选序列的检测效果进行了初步验证。最终本研究主要共得到了 19 条新的炭疽芽胞杆菌检测特异序列(genomic signatures),其中 6 条符合设计 TaqMan 探针建立实时定量 PCR 的要求,常规 PCR 验证后选择其中最优的 C04 片段建立了 TaqMan 荧光定量 PCR 检测体系,经试验验证本体系具有较理想的检测灵敏度和特异性,整个检测过程可以在 4h 以内完成,在炭疽芽胞杆菌诊断、环境污染的检测和应对突发生物突发事件等领域都有比较广阔的应用前景。而利用荧光定量检测体系中的 C04、*capB* 引物建立的双重 PCR 检测体系不仅可以用作一种基于普通 PCR 仪的检测方法,更为进一步研究炭疽芽胞杆菌多重实时定量 PCR 检测方法打下了基础;此外 C04 片段作为一种全新的特异序列用于炭疽芽胞杆菌实时定量 PCR 检测,国内外均未见报道,具有一定的创新性。

## 参 考 文 献

- [1] Erlendur H, Ole Að, Dominique AC, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-One species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(6):2627-2630.
- [2] Qi Y, Patra G, Liang X, et al. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(8):3720-3727.
- [3] Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH, et al. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol*, 1996, **178**(2):377-384.
- [4] Patra G, Sylvestre P, Ramisse V, et al. Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1996, **15**(4):223-231.

- [ 5 ] Jackson PJ, Walther EA, Kalif AS, et al. Characterization of the variable-number tandem repeats in *vrrA* from different *Bacillus anthracis* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(4):1400 – 1405.
- [ 6 ] Yamada S, Ohashi E, Agata N, et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(4):1483 – 1490.
- [ 7 ] Hurtle W, Bode E, Kulesh DA, et al. Detection of the *Bacillus anthracis gyrA* gene by using a minor groove binder probe. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**(1):179 – 185.
- [ 8 ] Chunsun R, Kyunghae L, Cheonkwon Y, et al. Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. *Microbiol Immunol*, 2003, **47**(10):693 – 699.
- [ 9 ] Daniele D, Sara B, Giuseppe F, et al. A randomly amplified polymorphic DNA marker specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(3):1298 – 1303.
- [ 10 ] Lyndsay R, Peter GA, Karen KH, et al. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(5):2755 – 2764.
- [ 11 ] Draghici S, Khatri P, Liu Y, et al. Identification of genomic signatures for the design of assays for the detection and monitoring of anthrax threats. *Pac Symp Biocomput*, 2005, 248 – 259.
- [ 12 ] Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 2003, **423**(6935):87 – 91.
- [ 13 ] 黄婷婷, 曹慧, 王兴祥, 等. 一种土壤微生物总 DNA 的高效提取方法. *土壤*, 2004, **36**(6):662 – 666.
- [ 14 ] Makino SL, Iinuma OY, Maruyama T, et al. Direct detection of *Bacillus anthracis* DNA in animals by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**(3):547 – 551.
- [ 15 ] Vincent R, Guy P, Henri G, et al. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **145**(1):9 – 16.
- [ 16 ] Michael WL, David Z, Kelly J, et al. Production and purification of *Bacillus anthracis* protective antigen from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2004, **38**(1):145 – 152.
- [ 17 ] Alex RH, Jacques R, David AR, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(22):8449 – 8454.
- [ 18 ] Timothy DR, Scott NP, Nicolas T, et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*, 2003, **423**(6935):81 – 86.
- [ 19 ] David AR, Michael RA, Cliff SH, et al. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, **29**(2):303 – 329.
- [ 20 ] 陈苏红, 张敏丽, 牟航, 等. 一种快速定量检测炭疽杆菌方法的建立. *中华检验医学杂志*, 2003, **26**(2):98 – 100.
- [ 21 ] 李伟, 俞东征, 海一荣, 等. 应用 TaqMan 荧光 PCR 定性定量检测炭疽芽孢杆菌. *中国人兽共患病杂志*, 2005, **21**(4):312 – 316.
- [ 22 ] 张玲, 翟俊辉, 周冬生, 等. 荧光定量 PCR 快速检测炭疽芽孢杆菌的实验研究. *中国人兽共患病杂志*, 2005, **21**(11):976 – 980.

## Screening and real-time quantitative detection for genomic signatures of *Bacillus anthracis*

RONG Guang-hua<sup>1</sup>, XIA Yi<sup>2</sup>, ZHU Shi-ying<sup>1</sup>, TONG Yi-min<sup>1</sup>, QI Zhong-tian<sup>\*</sup>

(<sup>1</sup> Department of Microbiology, Key Laboratory for Medical Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

(<sup>2</sup> Shanghai Fosun Medical Science Company Limited, Shanghai 200233, China)

**Abstract** : A total amount of 117 candidate chromosomal sequences were screened for the genomic signatures of *Bacillus anthracis* by a 2-step approach. Out of them, 19 genomic signatures sequences were selected, among which, 6 genomic signatures were competent as the target sequence of TaqMan real-time PCR method. With the most significant alignment and specificity, fragment C04, together with *pagA* gene and *capB* gene from virulence plasmids pXO1 and pXO2, was selected to establish a TaqMan real-time PCR assay. For each target sequence, as little as 10 to 100 copies per reaction could be detected. Twelve bacterial species including 7 from *Bacillus cereus* group which were closely related to *Bacillus anthracis* were used to test the specificity of this assay. Data revealed that the assay gained a 100% specificity. Further performance of the assay was assessed with 10 simulative contaminated environmental samples and 20 negative control environmental samples; all of the *Bacillus anthracis* contaminated samples gave strong positive signals while the control samples were negative. This specific and sensitive real-time PCR assay could be used in rapid confirmation or exclusion of potential bio-attacks and the diagnosis of anthrax.

**Keywords** : *Bacillus anthracis*, Genomic signature, Real-time quantitative detection, PCR

Foundation items Special Medical Research Project in the 11st Five-year Plan of PLA (06Z026) Special Funds for Military Medicine of SMMU (05JS01)

\* Corresponding author. Tel : 86-21-25070312 ; E-mail : qizt@smmu.edu.cn

Received 20 January 2006 / Accepted 5 April 2006 / Revised 24 June 2006