

• 基础实验研究论著 •

结核耐药基因多重荧光定量 PCR 快速检测方法的建立

祖冬梅, 曹以诚[△], 徐 焱

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要:目的 构建快速检测出结核分枝杆菌耐药基因的三重荧光定量 PCR 体系。方法 分别针对结核 3 个主要耐药基因 rpoB, katG, rpsL 设计特异性引物与 TaqMan MGB 探针, 构建并优化单管同时检测此 3 个突变点的三重荧光定量 PCR 体系, 验证方法的特异度、敏感度和稳定性。结果 成功构建了三重荧光定量 PCR 体系, 可以检测到 10 CFU/ μ L 结核杆菌。结论 该实验建立结核耐药基因三重荧光定量 PCR 具有良好的特异度、敏感度和重复性。该方法对快速检测结核耐药有重要意义。

关键词: 分枝杆菌, 结核; 抗药性, 微生物; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0925-03

Development of three-probe assay for rapid detection of drug-resistant mycobacterium tuberculosis by real-time PCR

Zu Dongmei, Cao Yicheng[△], Xu Yao

(Biological Science and Engineering College of South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: Objective To develop a new real-time fluorescent quantitative PCR system for detecting the drug-resistant gene mutation in mycobacterium tuberculosis (MTB). **Methods** Primers and probes specific to rpoB, katG, rpsL gene of mycobacterium tuberculosis were designed. A TaqMan MGB probe-based, real-time fluorescence quantitative PCR was established. The specificity, sensitivity and stability of the assay were assessed. **Results** The specificity of this established TaqMan MGB probe-based real-time fluorescence quantitative PCR was high and the detection sensitivity is 10 cfu/ μ L. The value of R2 were 0.997, 0.998 and 0.999 respectively and the efficiency of TaqMan MGB-based probe real-time fluorescent quantitative PCR assay was 99.511%, 99.286% and 102.114%. **Conclusion** This three probe-based real-time fluorescent quantitative PCR assay is specific, sensitive and repeatable in detection.

Key words: mycobacterium tuberculosis; drug resistance, microbial; polymerase chain reaction

耐多药结核病是指对 2 种或 2 种以上抗结核药物耐药的结核分枝杆菌引起的结核病, 它是人类消灭结核病目标的一大障碍^[1]。异烟肼(INH)、利福平(RFP)、链霉素(SM)作为一线抗结核药, 其耐药性的出现, 对感染耐药性结核的患者的治疗带来很大困难。目前结核分枝杆菌耐药的分子机制已基本阐明, 靶编码基因发生突变是结核分枝杆菌耐药的分子机制。荧光定量 PCR 是一种密闭的扩增检测体系, 具有敏感度、特异度高及方便快捷等优点, 特别是对难以培养与生长缓慢的结核杆菌的检测更有优势。MGB 探针能够准确检测基因单碱基的差异。本研究分别针对结核杆菌利福平耐药基因 rpoB 的 531 位点, 异烟肼耐药基因 katG 的 315 位点, 链霉素耐药基因 rpsL 的 43 位点设计特异的 MGB 探针, 构建单管同时检测 3 个不同基因的三重荧光定量 PCR 体系, 为结核耐药基因多重定量-PCR 检测试剂盒的研发奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料来源 阳性样本: 皮内注射用卡介苗, 由成都生物制品研究所提供。阴性样本: 含突变点基因片段由大连宝生物公司合成。

1.2 仪器与试剂 TIANamp Bacteria DNA Kit 试剂盒购自 TIANGEN 公司; PMD18-T 试剂盒购自大连宝生物公司; Ex Taq Taq Hot Start 热启动酶购自 TaKaRa 公司; 质粒小提试剂盒 plasmid mini kit I 购于 OMEGA 公司; life technologies 的 ABI 7500 多通道荧光 PCR 仪; Bibby Scientific 的 TC-plus 梯度 PCR 仪, minispn plus mini 14K 微型离心机购自杭州奥盛

仪器有限公司; 岛津公司的 UV-1800 紫外分光光度计。

1.3 提取卡介苗基因组 皮内注射用卡介苗, 每瓶含卡介苗约 1.0×10^6 CFU, 加入 500 μ L 无菌水, 按照 TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取。

1.4 引物和探针设计 使用 Primer premier 5.0 设计引物, rpoB 基因特异度引物根据 Genbank: L27989 的基因序列设计, katG 基因特异度引物根据 Genbank: X68081 的基因序列设计, rpsL 基因特异度引物根据 Genbank: L08011 的基因序列设计。使用 Primer Express 3.0 设计 MGB 探针, 探针根据野生型基因设计。引物和探针如表 1 所示, 均由 Life Technology 公司合成。

1.5 方法

1.5.1 目的基因扩增及测序 利用高保真 Taq DNA 聚合酶扩增目的基因片段, 所使用扩增引物及产物大小如表 1 所示, 连接到 PMD18-T 载体, 分别构建含 rpoB, katG, rpsL 突变位点的野生型质粒, 送至英俊公司测序。

1.5.2 普通 PCR 分别做单基因和多基因 PCR 扩增。采用 25 μ L 反应体系, 各组分终浓度为: 1 倍浓度缓冲液, dNTP 0.2 mmol/L, MgSO₄ 1.5 mmol/L, 热启动酶 0.5 U, 甜菜碱 0.4 mol/L, 二甲基亚砜(DMSO) 4%, 引物各 300 μ mmol/L, 模版 0.5 μ L。循环条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 40 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。每次扩增均设立阳性和阴性对照, 扩增产物在 4% 琼脂糖凝胶电泳后紫外灯下观察结果。

表 1 荧光定量 PCR 引物和探针

引物和探针	靶基因	引物序列(5'~3')	产物长度(bp)
引物	rpoB	5'-CAC CAG CCA GCT GAG CCA ATT C-3'	114
		5'-CAG CCC GGC ACG CTC AC-3'	
	katG	5'-GAG CTC GTA TGG CACCGG AAC-3'	97
		5'-CGA GGA AAC TGT TGT CCC ATT TCG TC-3'	
MGB 探针	rpsL	5'-GTC AAG ACC GCG GCT CTG AAG-3'	132
	rpoB/531	5'-NED-ACT GTC GGC GCT G-MGB-3'	
	katG/315	5'-HEX-ATC ACC AGC GGC AT-MGB-3'	
	rpsL/43	5'-FAM-AAG CCG AAC TCG GC-MGB-3'	

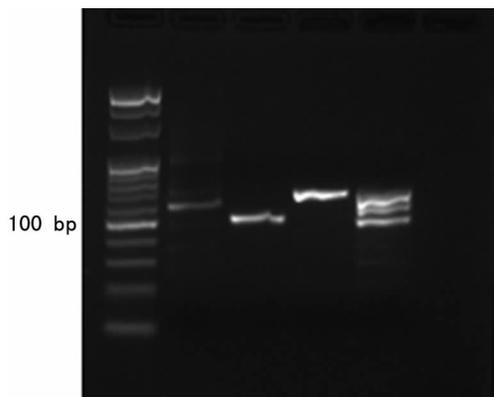
1.5.3 荧光 PCR 及优化 分别对荧光 PCR 体系的 Mg²⁺、引物、探针、甜菜碱、DMSO、酶的浓度进行优化,最终确定最佳反应体系为:缓冲液, dNTP 0.2 mmol/L, MgSO₄ 1.5 mmol/L, 热启动酶 0.5 U, 甜菜碱 0.4 mol/L, DMSO 4%, 引物各 300 μmol/L, 模版 0.5 μL。循环条件:94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 循环 40 次。

1.5.4 体系验证 (1)准确度实验。以构建的突变型质粒作为阴性对照模版,验证体系的准确性。预期结果为阳性模板出现曲线,阴性模板不出现曲线。(2)灵敏度实验。将模板稀释 3 个梯度,分别以不同梯度作为模板,验证体系的灵敏度,确定体系的最低检出下限。(3)稳定性实验。以 0.5×10³ CFU/μL 模板为参考,重复三批实验,批内设 3 个重复,统计每次反应的 3 个不同片段的 Ct 值,计算批内平均值,并分别计算批间变异系数(CV)和标准差(s)。

2 结 果

2.1 目的基因测序结果 使用 DNAMAN 6.0, 比对测序结果与 Genbank 序列,测序目的基因序列与 Genbank 序列完全一致,说明卡介苗可以作为野生型模板使用。

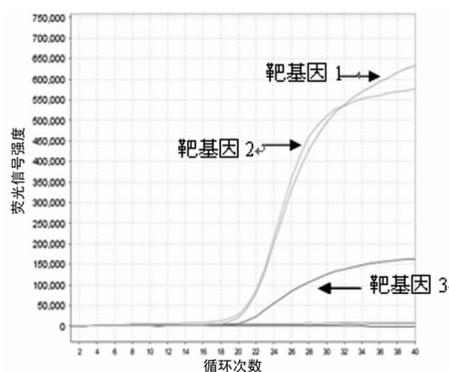
2.2 普通 PCR 产物电泳结果 rpoB, katG, rpsL 三个基因扩增片段的长度分别为 114、97、132 bp, 琼脂糖凝胶电泳结果显示三重基因单管扩增每条带的大小均与单基因扩增大小一致,说明三重基因扩增成功。见图 1。



由左到右分别为 20 bp Ladder 标记物; rpoB 扩增片段; katG 扩增片段; rpsL 扩增片段; 三重扩增片段。

图 1 普通 PCR 电泳图

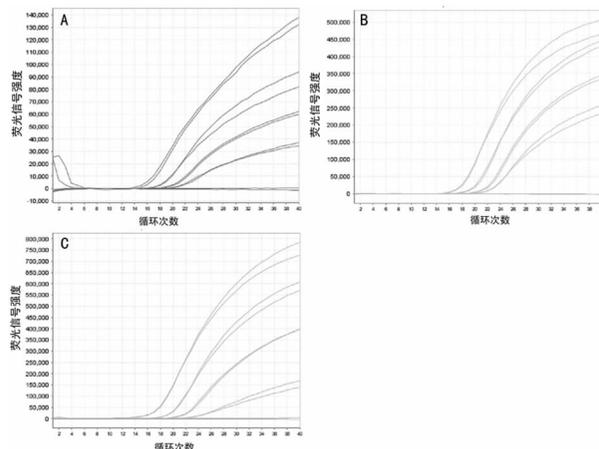
2.3 准确性验证实验结果 以构建的突变型质粒为阴性对照,结果三个阴性对照基因均没有荧光曲线出现,说明探针能够检测一个碱基的的差异,准确度很好。如图 2 所示。



靶基因 1~3 分别为 rpsL、katG、rpoB 扩增曲线。

图 2 三重荧光 PCR

2.4 灵敏度验证实验结果 4 个不同梯度的模板体系,三重体系的扩增中,每个基因的扩增均能看到明显的 Ct 值变化。因 30 循环以内为可参考数值,说明此反应体系,检测三个基因均能检测到下限为 0.5×10² CFU/μL。如图 3 所示。



A 为 rpoB 扩增荧光曲线; B 为 katG 扩增荧光曲线; C 为 rpsL 扩增荧光曲线。

图 3 4 种浓度梯度的模板三重荧光 PCR 情况

2.5 标准曲线 分别根据卡介苗模板 4 个不同梯度下, rpoB, katG, rpsL 片段荧光 PCR 扩增曲线,使用 7500 软件分析得到标准曲线, rpoB R²: 0.997 eff%: 99.511%, katG R²: 0.999 eff%: 102.114%, rpsL R²: 0.998 eff%: 90.286%。见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.6 稳定性验证实验结果 三个扩增片段的 Ct 值批间变异

系数小于 2%，结果说明此方法具有良好地准确度和重复性。

3 讨论

结核耐药问题,尤其是多重耐药和广泛性耐药,是目前结核治疗控制的主要瓶颈^[2]。2007 年调查结果显示,我国结核病患者中,将近 1/4 的患者对利福平和异烟肼一种或两种耐药,约 1/10 的患者表现为广泛性耐药^[3]。不断有研究表明,早期治疗是导致结核耐药的主要风险因素。结核病的耐药性诊断,目前主要据世界卫生组织结核病耐药监测方案推荐的药敏试验进行。虽然操作简单、容易推广,但所需时间长,易耽误最佳治疗时机。所以准确快速的诊断方法,对于结核治疗方案的实施具有重要的意义。此外,分子流行病学调查证实,结核杆菌耐药性与特定编码基因的突变紧密相关。我国不同地区利福平,异烟肼,链霉素 rpoB, katG, rpsL 耐药基因突变率大致相同,分别为 90.8%, 67%, 70%^[4]。其中, rpoB 基因 531 突变位点占利福平耐药的 44.6%~55.6%^[5-7], katG 基因 315 突变位点占异烟肼耐药的约 52.4%^[8-9], rpsL 基因的第 43 位点突变占链霉素耐药率大于 70%^[10]。目前分子水平检测结核耐药的技术有很多,但都有各自的缺点,影响到实际的应用。单链构象多态性分析(SSCP),该方法简便、快速、价廉,但只能判断基因有无突变,不能确定突变的部位和性质,某些耐药基因呈天然多态性或某些基因突变与耐药无关,可能导致假阳性。DNA 序列测定,自动化 DNA 测序仪的应用使测序效率大大提高,但这些仪器大部分是将荧光标记的测序反应产物进行电泳、记录和识读结果,价格昂贵,需在专业实验室进行,限制了其推广应用。基因芯片,简单,高通量,但对仪器依赖强。PCR-反向斑点杂交方法,比利时 Innogenetics 公司以及德国 Hain Lifescience 公司等应用此技术研发了结核耐药检测试剂盒,但此技术的准确性是个问题,可能出现假阳性^[11-12]。荧光定量 PCR 具有灵敏度高,特异度强,实时性好,可做多重反应的优点已经应用于耐药基因突变分析领域。分子信标、杂交探针、MGB 探针荧光定量 PCR 现今都已被用于结核分枝杆菌耐药性检测。本研究通过 GenBank 分别检索结核分枝杆菌 rpoB, katG, rpsL 基因库,得到 rpoB 基因序列,利用 Oligo Blast 软件针对三个不同基因的不同位点设计 3 条 MGB 探针,实现在同一试管内包含三种不同荧光标记探针,监测荧光 PCR 仪上三个不同通道试验数据,可以直接判断相应位点是否发生变异。减少临床检测的复杂度,加快患者的取报告时间。本实验在选择荧光标记时,考虑到荧光标记报告集团荧光信号强弱的差异,将荧光信号强的报告集团标记检测扩增效率低的片段的探针,从而实现三个荧光信号能在同一坐标显示。rpoB 片段 GC 含量较高,容易形成非特异扩增,添加甜菜碱和 DMSO 可大大减少非特异扩增。且 rpoB 片段 Tm 值较高,使所设程序的退火温度更接近 rpoB 片段,更有利于实现三重扩增。本实验的灵敏度检测限度为 10 CFU/μL,高浓度梯度下,模板中影

响因素多,会影响扩增效率。不同的提取方法获得的模板,因纯度不同, Ct 值也会有变化。本研究应用的 TaqMan MGB 双探针实时 PCR 技术结合了 MGB 探针的高度特异和实时 PCR 快速灵敏的优点,实现了单管三种荧光标记对不同基因不同突变位点的检测,取得较好结果,为结核耐药检测试剂盒的研发奠定了基础。

参考文献

- [1] Telenti A, Iseman M. Drug-resistant tuberculosis: what do we do now? [J]. *Drugs*, 2000, 59(2): 171-179.
- [2] Cheepsattayakorn A, Cheepsattayakorn R. Novel compounds and drugs and recent patents in treating multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis [J]. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2012, 7(2): 141-156.
- [3] Zhao Y, Xu S, Wang L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(23): 2161-2170.
- [4] 包洪, 于庭, 印璞, 等. 中国部分地区结核分枝杆菌耐利福平、异烟肼和链霉素耐药基因的检测 [J]. *中国实验诊断学*, 2007, 11(2): 232-234.
- [5] 王伟华, 刘伟. 快速方法检测耐利福平结核分枝杆菌基因突变的研究 [J]. *山东医药*, 2009, 49(9): 89-90.
- [6] 曹立雪, 林艳丽, 吴雪琼. 结核分枝杆菌利福平耐药性的研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2004, 15(1): 79-82.
- [7] Tang X, Morris SL, Langone JJ, et al. Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with drug resistance [J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 63(3): 318-330.
- [8] 薛欣, 邱奕, 楚烈刚, 等. 结核分枝杆菌异烟肼耐药基因 katG 的检测 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2010, 5(7): 496-497.
- [9] Abal AT, Ahmad S, Mokaddas E. Variations in the occurrence of the S315T mutation within the katG gene in isoniazid-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait [J]. *Microb Drug Resist*, 2002, 8(2): 99-105.
- [10] 梁建琴, 吴雪琼, 曹立雪, 等. 应用 PCR-反向斑点杂交技术快速检测结核分枝杆菌耐链霉素基因型 [J]. *中国医师杂志*, 2004, 6(9): 1170-1172.
- [11] Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, et al. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(2): 350-352.
- [12] Huang WL, Chen HY, Kuo YM, et al. Performance assessment of the GenoType MTBDRplus test and DNA sequencing in detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(8): 2520-2524.

(收稿日期: 2012-12-03)

欢迎投稿

欢迎订阅