

• 检验技术与方法 •

烟曲霉实时 PCR 检测方法的建立*

曹国君¹, 邢志芳², 华 丽³, 赵 芳¹, 顾文红¹, 潘惠芬¹, 赵 臻^{1△}

(上海市闵行区中心医院:1. 检验科;2. 输血科, 上海 201199;3. 上海交通大学公共卫生学院, 上海 200025)

摘要:目的 建立一种针对烟曲霉菌进行检测的实时 PCR 方法。方法 以烟曲霉菌线粒体基因组内特有序列为靶位, 设计引物, 建立实时 PCR 反应体系, 并初步验证其检测性能。结果 所建立的 PCR 法具有较好的敏感度、稳定性和特异性, 检测线性范围为 $10^2 \sim 10^8$ copies/mL。结论 所建立的烟曲霉实时 PCR 法具有较好的敏感度、稳定性和特异性, 检测性能良好, 具体临床应用价值需要经多中心实验进一步验证。

关键词: 烟曲霉菌; 聚合酶链反应; 敏感性与特异性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.06.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)06-0731-02

PCR method established for the detection of aspergillus fumigatus*

Cao Guojun¹, Xing Zhifang², Hua Li³, Zhao Fang¹, Gu Wenhong¹, Pan Hui fen¹, Zhao Zhen^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Blood Transfusion, Shanghai Minhang District Central Hospital, Shanghai 201199, China; 3 Shanghai Jiaotong University School of Public Health, Shanghai 200025, China)

Abstract: Objective To establish a PCR method for the detection of aspergillus fumigatus. **Methods** Design a pair of special primers during the target sequences of aspergillus fumigatus mitochondrion gene. And the PCR reaction system was established by preliminary verification of its performances. **Results** The PCR method established had good sensitivity, stability and specificity with a detection linear range of from 10^2 to 10^8 copies/mL. **Conclusion** The PCR method established have good performances. But the clinical use of this method needs to be verified by more multi-center research.

Key words: aspergillus fumigatus; polymerase chain reaction; sensitivity and specificity

随着科学技术的不断发展和医疗水平的不断提高,越来越多的患有白血病、艾滋病、糖尿病等疾病的人群得到了及时的救治,生命得以延续,但随着广谱抗菌药物、糖皮质激素、细胞毒药物及免疫抑制剂在临床被广泛应用,免疫低下人群数量也不断增多^[1-6],接踵而至的是条件致病菌引起的感染频繁发生,尤其是侵袭性曲霉菌感染,成为临床治疗中的棘手问题,再一次危及到了患者的生命安全,当前已引起了大家的重视^[7-9]。早期有效的抗真菌治疗可以明显改善疾病预后,而当前实验室内的常规检测方法由于其敏感性和耗时性等缺陷,难以满足临床的需求,亟需寻求一种更加灵敏和特异的检测方法,为目前临床真菌感染的早期诊断、预防和治疗提供有效工具。随着近年来对真菌病原研究的不断深入,使人们重新看到了真菌 PCR 在临床应用的曙光,本实验建立了一种针对烟曲霉病原菌进行检测的实时 PCR 法,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 烟曲霉菌标准株(ATCC10896)基因组 DNA,白色念珠菌标准株(ATCC90028)基因组 DNA,解脲支原体基因组 DNA,人基因组 DNA,人巨细胞病毒(HCMV)基因组 DNA,HBV 基因组 DNA。

1.2 仪器与试剂 溶壁酶 lyticase (Sigma, L4025, 900 U/mL),核糖核酸酶 A (Sigma, Rc-R5500, 10 mg/mL),蛋白酶 K (Biotech, LJ0127A2010J, 20 mg/mL, >30 U/mg),三羟甲基氨基甲烷-盐酸-乙二胺四乙酸缓冲液(TE, 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 10 mmol/L, pH 8.0, 乙二胺四乙酸缓冲液 1 mmol/L); 酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, 上海生工), SYBR Premix ExTaq 试

剂盒(宝生物, RR420A), 100 bp DL500 DNAladder Marker。紫外分光光度计(Beckman coulter, DU730), 冷冻离心机(Eppendorf, 5415R), 生物安全柜(Thermo), PCR 扩增仪(ABI7300), 柯达凝胶成像系统(Carestream, Image Station4000R)。

1.3 方法

1.3.1 真菌基因组 DNA 的提取 方法同前期实验^[10]。

1.3.2 烟曲霉实时 PCR 法的建立 将烟曲霉线粒体基因序列在 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 数据库中进行比对,找出特有的靶序列部分,在靶序列上设计一对,上游引物:5'-CTT GAA TAC TTC AGT AAC T-3',下游引物:5'-CCT CTA TTT ACT AAA TCA TC-3',靶片段长度 132 bp。PCR 反应总体积为 50 μ L,各成分用量参照 SYBR Premix Ex-Taq 试剂盒说明书;PCR 反应条件为:50 $^{\circ}$ C, 2 min;94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火延伸 40 s,共 40 个循环。构建含靶片段的 TA 克隆质粒(委托宝生物公司完成),制备梯度浓度的双份样本,具体浓度为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 copies/mL,进行 PCR 扩增并作融解曲线分析,验证该方法的敏感性、稳定性与特异性,同时分别以非烟曲霉菌基因组 DNA,即白色念珠菌标准株(ATCC90028)基因组 DNA、解脲支原体基因组 DNA、人基因组 DNA、人巨细胞病毒(HCMV)基因组 DNA 和 HBV 基因组 DNA 为模板,进一步验证该方法的特异性;将 PCR 产物外送测序,验证方法的可靠性。

2 结果

PCR 扩增标准曲线的斜率-3.014 383,截距 40.882 465,

相关系数(r^2)=0.997 539,提示具有较好的相关性,满足实验要求,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。该 PCR 检测体系的检测敏感性方面,线性检测范围的下限可至 10^2 copies/mL,上限可达 10^8 copies/mL;双份样本的检测结果总体一致,提示该 PCR 检测体系的重复性、稳定性较好,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”);溶解曲线分析显示为单峰, $T_m=74.1^\circ\text{C}$,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),此外,以非烟曲霉菌基因组 DNA 为模板时均无扩增曲线出现,证明本 PCR 扩增体系的特异性较好;将 PCR 产物外送测序(英俊公司),结果符合预期。

3 讨 论

侵袭性真菌感染(IFD)十分普遍,主要由念珠菌属、曲霉属、隐球菌属等机会致病真菌(或条件致病真菌)引起,也可由组织胞浆菌、皮炎芽生菌、孢子丝菌等地方流行性致病真菌所致,其中,曲霉菌属已成为免疫低下患者二次感染的重要致病因素,IFD 的早期诊断和早期治疗对于改善患者预后有着重要意义^[11-12],而当前真菌感染的特点是高院内感染率、低实验室诊断率、低临床诊断率和病情进展迅速,传统诊断方法包括深部组织培养法、组织/细胞病理学检测、1-3- β -D 葡聚糖(G 试验)、半乳甘露聚糖检测(GM 试验)和影像学检查(如 CT)等,由于它们在敏感性、特异性等方面存在缺陷,难以满足临床早期诊断的需要,如何提高 IFD 的早期诊断、早期治疗是国内外学者关注的热点问题,所以近年来 IFD 的早期诊断方法的研究被广泛开展,虽然当前仍处于实验室研究阶段,但其应用前景广阔,值得期待。

PCR 为基础的诊断学方法冷落的原因如下。(1)真菌的细胞壁坚固,破壁困难,从复杂的临床标本中提取真菌 DNA 的效率已成为阻碍提高诊断水平的重要因素;(2)当前没有设计出合适的质控对照,操作难以实现标准化;(3)相对其他病原菌,真菌的污染更加难以控制,易出现假阳性,真菌的孢子可呈气溶胶方式存在于自然环境中,他们对试剂和标本的污染会导致其检测结果产生假阳性,为此,Mengoli 等^[13]强调,为有效避免标本 DNA 提取过程的交叉污染,实施 PCR 检测真菌基因的实验室必须健全防范措施,其中包括在 PCR 操作前或后采用单方向的工作流模式,PCR 分析前后实验操作要在不同的实验室进行(物理隔离),使用防气溶胶的枪头和层流净化罩,以及在 PCR 反应混合体系中,应当使用尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)和脱氧尿嘧啶(dUTP)代替三磷酸胸腺嘧啶脱氧核苷酸(dTTP),最终消除体系中存在的污染物;(4)最佳临床检测样本种类的选择国内外均尚未达成共识;然而,在过去的十年中真菌的 PCR 诊断依然取得了明显的进步,本实验以烟曲霉线粒体基因组上的特异性序列为靶位,建立了敏感性、稳定性和特异性均较好的 PCR 检测体系,将在下一步工作中应用于临床标本的检测,探讨其临床应用价值,使侵袭性烟曲霉病的早发现、早治疗成为可能,为实验室诊断率和临床诊断率的提高初步奠定了基础^[14-23]。

参考文献

[1] 孙铮,赵作涛,万喆,等.烟曲霉感染的宿主防御机制以及相关免疫学研究进展[J].中国真菌学杂志,2010,5(5):307-311.

- [2] 祁卉卉,谢国钢,金先桥. COPD 患者痰真菌培养阳性的相关因素[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2010,9(6):591-594.
- [3] 欧阳录明,胡永轩,杨群英. 76 例深部真菌肺感染临床分析[J]. 现代临床医学,2010,36(6):432-433.
- [4] 李芳秋,周万青,王立魁,等. 巢式 PCR 检测血清中烟曲霉基因的实验研究[J]. 中国实验室诊断,2011,15(1):62-65.
- [5] 刘周阳,曹永彬,闫蓓,等. 白血病患者并发真菌肺炎行异基因移植 7 例临床分析[J]. 临床肺科杂志,2011,16(1):76-77.
- [6] 卢洪洲,沈银忠. 艾滋病患者侵袭性真菌感染的诊断[J]. 诊断学理论与实践,2010,9(6):545-548.
- [7] 王剑磊. 侵袭性曲霉病的临床诊断[J]. 中国药物与临床,2011,11(1):54-55.
- [8] 李红,董会敏,赵彦珍,等. 恶性血液病继发肺部真菌感染病原学诊断研究[J]. 河北医药,2011,33(2):235-236.
- [9] 谢震,王岩,孙晓红. 1 例肾移植术后并发颅内真菌感染患者的护理[J]. 实用医药杂志,2011,28(1):49-50.
- [10] 曹国君,赵筑,彭奕冰,等. 真菌基因组 DNA 的提取和检测用通 PCR 方法的建立[J]. 检验医学,2011,26(11):773-778.
- [11] Maertens J, Meersseman W, Van Bleyenbergh P. New therapies for fungal pneumonia[J]. Curr Opin Infect Dis, 2009, 22(2): 183-190.
- [12] Einsele H, Loeffler J. Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk hematology patients[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14 Suppl 4: 37-45.
- [13] Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, et al. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(2): 89-96.
- [14] 毛璞,余志辉,黄红川,等. 荧光定量 PCR 法检测烟曲霉 DNA[J]. 临床检验杂志,2011,29(3):165-167.
- [15] 刘金华,史艳宇,贺丹,等. 应用实时荧光 PCR 技术检测烟曲霉的初步研究[J]. 生物技术,2009,19(1):34-36.
- [16] 王迎华,曹郁生,高丹丹. 烟曲霉检测技术研究进展[J]. 食品科技,2007,32(4):197-200.
- [17] 赵军,李若瑜,孔繁荣,等. 巢式聚合酶链反应检测烟曲霉基因[J]. 中华皮肤科杂志,2001,34(5):385-386.
- [18] Zarrinfar H, Mirhendi H, Makimura K, et al. Use of mycological, nested PCR, and real-time PCR methods on BAL fluids for detection of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* in solid organ transplant recipients[J]. Mycopathologia, 2013, 176(5/6): 377-385.
- [19] Abad-Diaz-De-Cerio A, Fernandez-Molina JV, Ramirez-Garcia A, et al. The aspHS gene as a new target for detecting *Aspergillus fumigatus* during infections by quantitative real-time PCR[J]. Med Mycol, 2013, 51(5): 545-554.
- [20] Mahmood RT, Asad MJ, Mehboob N, et al. Production, purification, and characterization of exoglucanase by *Aspergillus fumigatus*[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 170(4): 895-908.
- [21] 李芳秋,周万青,王立魁,等. 巢式 PCR 检测血清中烟曲霉基因的实验研究[J]. 中国实验诊断学,2011,15(1):62-65.
- [22] 谢莉萍,刘霆,向兵. 侵袭性曲霉病的诊断[J]. 华西医学,2006, 21(2):390-391.
- [23] 余进,李若瑜. 侵袭性烟曲霉感染早期诊断的实验研究[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(9):534-536.

(收稿日期:2013-11-13)