

• 论 著 •

TaqMan 荧光定量 PCR 检测新型隐球菌方法的建立

韩 慧¹, 黄福达¹, 张秀明¹, 吴炳义^{2△}

(1. 中山大学附属中山医院/中山市人民医院检验医学中心, 广东中山 528403;

2. 南方医科大学南方医院临床医学实验研究中心, 广州 510515)

摘要:目的 建立 TaqMan 荧光定量 PCR 方法定量检测新型隐球菌基因组 DNA, 为检测隐球菌性脑膜炎提供重要方法。方法 在国家生物技术信息中心 (NCBI) 查找新型隐球菌各亚型的 ITS-rDNA 序列, 序列比对后设计特异性引物和探针, 扩增片段为 114 bp, 构建质粒标准品, 调整质粒浓度为 1.42×10^8 copy/ μ L ~ 1.42×10 copy/ μ L 共 8 个浓度梯度, 分别取 2 μ L 作为模板, 优化反应条件, 建立标准曲线, 进行敏感性、特异性、重复性评价, 并检测临床确诊的 15 例隐球菌脑膜炎感染菌株。结果 建立的荧光定量 PCR 可以检测 2.84×10^2 拷贝的质粒 DNA, 对临床分离的各 10 例其他真菌、细菌、乙型肝炎病毒 DNA 和人类基因组 DNA 均无扩增曲线, 重复性良好, 3 个浓度的批间变异系数分别为 2.86%、1.48%、1.36%, 可准确检测 15 例新型隐球菌。结论 成功建立检测新型隐球菌的荧光定量 PCR 方法, 敏感性和特异性较高, 结果稳定可靠, 可早期、快速诊断隐球菌性脑膜炎。

关键词: 荧光定量 PCR; 新型隐球菌; 基因组 DNA

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.015

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)19-2697-03

Establishment of TaqMan probe real-time PCR for detection of *Cryptococcus neoformans*HAN Hui¹, HUANG Fuda¹, ZHANG Xiuming¹, WU Bingyi^{2△}

(1. Center of Laboratory Medicine, Zhongshan Hospital of Sun Yat-sen University, Zhongshan, Guangdong 528403,

China; 2. Research Center of Clinical Medicine, Nanfang Hospital Affiliated of

Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: **Objective** To establish TaqMan probe real-time Fluorescent Quantitative PCR in detecting *Cryptococcus neoformans* genomic DNA, and to provide important method for detection of cryptococcal meningitis. **Methods** According to the *Cryptococcus neoformans* ITS-rDNA sequences obtained from NCBI, specific primers and probe were designed based on the conserved sequences, a specific 114 bp fragment was amplified by primers and probe, then recombinant plasmid was constructed. Eight different concentrations from 1.42×10 copy/ μ L to 1.42×10^8 copy/ μ L were used as templates by 2 μ L. In the optimum reaction condition, the sensitivity, specificity and repeatability were evaluated and standard curve was established. 15 clinical cryptococcal meningitis strains isolated from clinical diagnosis patients were detected. **Results** The real-time PCR showed high sensitivity and specificity and was able to detect 2.84×10^2 copies of plasmid DNA. The detection sensitivity was 2.84×10^2 copies plasmid DNA by real-time PCR, no amplification curve was detected with human genomic DNA, other fungus, bacterias and viruses. The CV of inter-assay were 2.86%, 1.48% and 1.36% respectively with excellent reproducibility. Fifteen clinical isolated strains could be detected accurately. **Conclusion** A method of detection of *Cryptococcus neoformans* DNA by real-time PCR is established successfully with high sensitivity and specificity, and the results are stable, could diagnose cryptococcal meningitis rapidly and early.

Key words: real-time PCR; *Cryptococcus neoformans*; genomic DNA

新型隐球菌是一种条件致病菌, 主要通过呼吸道进入肺部, 引起炎性或隐性感染。机体免疫功能降低, 侵袭中枢神经系统, 导致隐球菌性脑膜炎。由于该病早期无明显症状和体征, 脑脊液变化不典型, 很难与其他疾病相鉴别, 易被误诊而延误治疗。新型隐球菌脑膜炎的确诊主要依据脑脊液墨汁染色检测新型隐球菌, 但早期涂片染色阳性率低, 因此建立一种早期、快速诊断隐球菌的方法至关重要^[1-3]。

1 材料与方

1.1 一般材料 新型隐球菌菌株来自广州市微生物研究所和检验科临床分离的菌株, 脑膜炎双球菌、白色念珠菌、热带念珠菌、黄曲霉、黑曲霉各 10 例及乙型肝炎病毒 DNA 和人类基因组 DNA 各 2 例作为阴性对照 (检验科)。酵母基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根), 溶壁酶 (东盛生物), Premix Ex TaqTM 和 pMD20-T 载体购自 TAKARA, 荧光定量 PCR 仪器为 Stratagene MX3005P。

1.2 引物和探针 在国家生物技术信息中心 (NCBI) 查找新型隐球菌各亚型的 ITS-rDNA 序列, 比对后找出其共同的保守序列设计引物和探针, 探针 5' 端标记荧光报告基团 FAM, 3' 端标记荧光淬灭基团 TAMRA, 序列上游引物: 5'-GTT GGA CTT GGA TTT GGG TGT T-3'; 下游引物: 5'-GGC CCA GCG AAA CTT ATT ACG-3'。TaqMan 探针: 5'-FAM-CGA CCT GCA AAG GAC GTC GGC TC-T AMR A-3', 扩增片段长度为 114 bp。引物和探针由上海生工合成。

1.3 DNA 提取和质粒构建 新型隐球菌株及隐球菌感染的脑脊液标本接种在沙保罗液体培养基中, 37 °C 振荡培养 24 h, 取 2 mL 离心留沉淀, 使用溶壁酶和基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。采用上、下游引物扩增 DNA 模板, 应用 PCR 产物, 按照 pMD20-T 载体试剂盒说明, 连接后转入 DH5 α 大肠杆菌的感受态细胞内, 涂板, 筛选阳性克隆, 华大生物公司测序, 经测序鉴定为目的质粒。使用核酸测定仪测定质粒浓度, 计算

质粒拷贝数,运用无菌去离子水进行 10 倍梯度稀释,每个梯度做 3 个重复,同时以无菌去离子水为空白对照,以 $2.84 \times 10^8 \sim 2.84 \times 10^2$ 拷贝作标准曲线。

1.4 荧光定量 PCR 反应体系 反应体系为 25 μL , Premix 12.5 μL , 上、下游引物(终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 探针(终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)为 1 μL , 内参染料 ROX 0.5 μL , 模板 2 μL , 去离子水补足至 25 μL , 同时做空白对照。反应条件为 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 95 $^\circ\text{C}$ 5 s, 60 $^\circ\text{C}$ 20 s, 40 个循环。

1.5 标准曲线制作和敏感性 将构建的新型隐球菌质粒定量后,进行 10 倍的梯度稀释,调整浓度为 1.42×10^8 copy/ μL ~ 1.42×10^0 copy/ μL , 分别取 2 μL 作为模板,每个梯度做 3 个重复,按照上述建立的反应条件进行检测,反应结束后以最低检测浓度值作为检测敏感性,同时仪器自动绘制标准曲线。

1.6 荧光定量 PCR 特异性 按上述反应条件同时检测脑膜炎双球菌、白色念珠菌、热带念珠菌、黄曲霉、黑曲霉等 DNA, 检测乙型肝炎病毒 DNA 和人类基因组 DNA, 观察扩增结果。提取 15 例隐球菌患者脑膜炎的脑脊液标本 DNA, 使用上述引物和探针进行检测。

1.7 荧光定量 PCR 重复性 选取 1.42×10^7 、 1.42×10^5 、 1.42×10^3 copy/ μL 3 个浓度为模板,每天进行 1 次实验,每次每个梯度做 3 次重复,连续检测 3 d, 使用同一台 PCR 仪器,根据 CT 值计算 CV 值,观察重复性和稳定性。

2 结 果

2.1 荧光定量 PCR 标准曲线 构建新型隐球菌质粒测序图及对比结果,以每个反应浓度 $2.84 \times 10^8 \sim 2.84 \times 10^2$ 拷贝制作标准曲线,扩增曲线良好,各浓度与 CT 值之间呈很好的负相关关系,标准曲线 $Y = -3.354 \log(X) + 45.73$, 相关系数为 0.998, 说明具有很好的线性关系。

2.2 荧光定量 PCR 的敏感性 调整质粒的浓度为 1.42×10^8 copy/ μL ~ 1.42×10^0 copy/ μL , 分别取 2 μL 作为模板,在 $2.84 \times 10^8 \sim 2.84 \times 10^2$ 拷贝浓度范围内,起始模板的浓度与 CT 值呈负相关关系和线性关系,因此敏感性为 2.84×10^2 拷贝的质粒 DNA。

2.3 荧光定量 PCR 的特异性 应用建立的 PCR 方法扩增脑膜炎双球菌、白色念珠菌、热带念珠菌、黄曲霉、黑曲霉、乙型肝炎病毒 DNA 和人类基因组 DNA, 结果显示均无任何扩增曲线,说明特异性良好。检测脑脊液提取的 DNA, 提示均有较好的扩增曲线,表明设计的引物和探针可准确检测新型隐球菌致病菌株。

2.4 荧光定量 PCR 的重复性 选取 3 个浓度进行检测,连续 3 d 检测 3 次,每次均做 3 个重复, 2.84×10^7 拷贝的 CT 值为 (20.99 ± 0.60) , CV 值为 2.86%, 2.84×10^5 拷贝 CT 值为 (28.32 ± 0.42) , CV 值为 1.48%, 2.84×10^3 拷贝 CT 值为 (34.38 ± 0.47) , CV 值为 1.36%, 3 个浓度的批间 CV 值均小于 5%, 说明重复性和稳定性优良。

3 讨 论

近年来,由于抗菌药物和免疫抑制剂的大量应用,脑膜炎的发病率呈上升趋势,特别是病死率高的隐球菌性脑膜炎,其病情较严重,但早期临床表现、生化指标缺乏特异性,与结核性脑膜炎、病毒性脑膜炎临床表现相似,易误诊,且晚期缺乏有效的治疗药物,致残率和病死率极高^[4]。目前墨汁染色显微镜检查和脑脊液培养仍是隐球菌脑膜炎诊断的金标准,但实际应用中阳性率低,敏感性和特异性差、耗时长,且应进行抗菌药物治疗的患者不易检出阳性结果,而脑膜炎患者的治疗效果和预

后,与其能否早期诊断和合理治疗密切相关。

以 PCR 为基础的核酸扩增技术已逐渐应用于临床,成为实验室快速诊断方法,其已广泛应用于真菌性疾病的诊断^[5-7],也逐渐应用于隐球菌感染的诊断^[8-9]。该方法敏感性高、特异性强,可以早期从少量标本中检出病原菌,与传统培养法比较,可快速、可靠、高敏感性和高特异地诊断感染性疾病^[10-11]。

本研究采用荧光定量 PCR 探针法,通过比对各亚型的 ITS-rDNA 序列,依据保守序列设计特异性引物和探针,该方法较普通 PCR 操作简单,自动化程度高,无需后续的电泳,极大地减少了反应产物的污染,整个反应过程 2 h 内即可完成。特异性强,与其他真菌、细菌、病毒和人类基因组 DNA 均无交叉反应。敏感性高,最低可检测 284 个拷贝的质粒 DNA,根据扩增曲线和 CT 值观察结果,通过标准曲线可准确定量起始模板量。使用该方法检测 5 例脑脊液分离菌株,均有明显的扩增曲线,说明设计的引物和探针能准确应用于临床标本检测。在今后的研究工作中,应检测更多的脑脊液标本以评价该方法的临床应用价值。

本研究建立的 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测新型隐球菌基因组 DNA,具有良好的敏感性、特异性、重复性,可早期准确地诊断隐球菌性脑膜炎,为临床诊断和治疗提供重要的依据。

参考文献

- [1] 王志娇,肖农. 儿童新型隐球菌脑膜炎 17 例临床分析[J]. 重庆医学, 2008, 37(24): 2824-2825.
- [2] Mccann S, Byrne JL, Rovira M, et al. Outbreaks of infectious diseases in stem cell transplant units; a silent cause of death for patients and transplant programmes[J]. Bone Marrow Transplant, 2004, 33(5): 519-529.
- [3] Gago S, Esteban C, Valero C, et al. A multiplex real-time PCR assay for identification of *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* in samples from AIDS patients with opportunistic pneumonia[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(4): 1168-1176.
- [4] 张志,黄宗青,沈琪,等. 新型隐球菌性脑膜炎分子诊断方法的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(10): 1185-1187.
- [5] Ferrer C, Colom F, Frasés S, et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(8): 2873-2879.
- [6] Itahashi M, Higaki S, Fukuda M, et al. Detection and quantification of pathogenic bacteria and fungi using real-time polymerase chain reaction by cycling probe in patients with corneal ulcer[J]. Arch Ophthalmol, 2010, 128(5): 535-540.
- [7] 张伟铮,肖倩,屈平华,等. ITS 基因序列分析在鉴定暗色真菌中的应用[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(15): 2493-2496.
- [8] Tavares ER, Azevedo CS, Panagio LA, et al. Accurate and sensitive real-time PCR assays using intergenic spacer 1 region to differentiate *Cryptococcus gattii sensu lato* and *Cryptococcus neoformans sensu lato*[J]. (下转第 2701 页)

2G 与 MMP-1 的表达及癌症预后紧密相关。MMP-1 导致肿瘤的原因,可能是 MMP-1 启动子第 1 607 位点基础序列是 5'-GA-3',如果插入鸟嘌呤形成 5'-GGA-3',其是转录因子 Ets 的结合位点,两者结合使得 MMP-1 转录水平增高,促进肿瘤形成。

本研究存在 2 个局限性:(1)语言限制,只纳入了东亚地区人群而未纳入全球其他地区人群,相关文献较少。(2)未考虑影响因素,包括病例组和对照组的年龄分布、体质量、饮食习惯等。因此本组尽管不能证实 MMP-1-1607bp1G/2G 多态性与宫颈癌易感性有关,但也不能排除两者之间不存在相关性。

MMP-7 又称基质溶解因子,是 MMP 家族里相对分子质量最小的蛋白酶,有广泛的底物特异性,能降解弹性蛋白、蛋白多糖、纤连蛋白、IV 型胶原^[15-16]。MMP-7 过表达与上皮恶性肿瘤细胞有关。高表达的 MMP-7-181 G 等位基因可以改变细胞表面信号,包括细胞增殖、侵袭、凋亡过程,导致拥有高表达 MMP-7-181 G 的个体更易恶性转变^[17]。Kesh 等^[18]研究表明,印度人 GG 基因型胃癌发病风险是 AA 基因型的 1.9 倍。本研究结果显示,宫颈癌 A 等位基因是保护性因子而 G 是危险因子。

综上所述,MMP-7-181bpA/G 启动子基因多态性与宫颈癌易感性有关,A 等位基因是保护性因子。目前的文献尚不能证实 MMP-1-1607bp1G/2G 与宫颈癌易感性的相关性。

参考文献

- [1] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(3):161-174.
- [2] Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases[J]. Matrix Biology, 2000, 19(7):623-629.
- [3] 邹力,李法琦,周平. 缓激肽 β_2 受体基因-58T/C 多态性与高血压病发病风险的 Meta 分析[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(10):1555-1559.
- [4] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, et al. 系统综述和荟萃分析优先报告的条目:PRISMA 声明[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(9):889-896.
- [5] Nishioka Y, Sagae S, Nishikawa A, et al. A relationship between Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and cervical cancer progression[J]. Cancer Lett, 2003, 200(1):49-55.
- [6] Ju W, Kang S, Kim JW, et al. Promoter polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and risk of cervical cancer in Korean women[J]. Cancer Lett, 2005, 217(2):191-196.
- [7] Lai HC, Chu CM, Lin YW, et al. Matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism as a prognostic predictor of invasive

cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2005, 96(2):314-319.

- [8] 韩海琼,邵淑丽,韩爱红. 基质金属蛋白酶-1 单核苷酸多态性在宫颈癌中的表达及临床意义[J]. 中国药物与临床, 2009, 9(2):125-126.
- [9] Singh H, Jain M, Mittal B. MMP-7 (-181A>G) promoter polymorphisms and risk for cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(1):71-75.
- [10] Wu S, Lu S, Tao H, et al. Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis of early stage cervical cancer[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences, 2011, 31(1):114-119.
- [11] 陶慧娟,吴素慧,张莉,等. 白细胞介素-8 和基质金属蛋白酶-7 基因多态性与山西地区早期宫颈癌发病风险的相关性研究[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(8):852-854.
- [12] Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription[J]. Cancer Res, 1998, 58(23):5321-5325.
- [13] Liu L, Wu J, Wu C, et al. A functional polymorphism (-1607 1G→2G) in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with development and progression of lung cancer[J]. Cancer, 2011, 117(22):5172-5181.
- [14] Zhou J, Brinckerhoff C, Lubert S, et al. Analysis of matrix metalloproteinase-1 gene polymorphisms and expression in benign and malignant breast tumors[J]. Cancer Invest, 2011, 29(9):599-607.
- [15] Miyazaki K, Hattori Y, Umenishi F, et al. Purification and characterization of extracellular matrix-degrading metalloproteinase, matrin (pump-1), secreted from human rectal carcinoma cell line[J]. Cancer Res, 1990, 50(24):7758-7764.
- [16] Wilson CL, Matrisian LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1996, 28(2):123-136.
- [17] Holler N, Tardivel A, Kovacsovic-Bankowski M, et al. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(4):1428-1440.
- [18] Kesh K, Subramanian L, Ghosh N, et al. Association of MMP7-181A→G promoter polymorphism with gastric cancer risk; influence of nicotine in differential allele-specific transcription via increased phosphorylation of cAMP-response element-binding protein (CREB) [J]. J Biol Chem, 2015, 290(23):14391-14406.

(收稿日期:2016-02-12 修回日期:2016-04-16)

(上接第 2698 页)

- [8] Med Mycol, 2016, 54(1):89-96.
- [9] 韩慧,胡子有,吴炳义. 荧光定量 PCR 和环介导等温扩增方法检测隐球菌 CAP10 基因的比较研究[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(6):817-820.
- [10] Susever S, Yeenolu Y. Evaluation of the significance of molecular methods in the diagnosis of invasive fungal infections: comparison with conventional methods[J]. Mik-

robiyol Bul, 2011, 45(2):325-335.

- [11] Han H, Hu Z, Sun S, et al. Simultaneous detection and identification of bacteria and fungi in cerebrospinal fluid by TaqMan probe-based real-time PCR[J]. Clin Lab, 2014, 60(8):1287-1293.

(收稿日期:2016-02-13 修回日期:2016-04-24)