

论著·基础研究

快速鉴定结核杆菌的双重分子信标检测体系的优化^{*}

余传星¹, 张 煥^{2#}, 黄明翔^{3#}, 赵自云², 朱 玲^{2△}

(1. 福建中医药大学附属第二人民医院内科, 福州 350003; 2. 福建医科大学基础免疫系及神经生物学研究中心, 福州 350004; 3. 福建省福州肺科医院检验科, 福州 350008)

摘要:目的 优化双重分子信标的实验体系以快速检测结核杆菌及其耐药菌株。方法 选择不同镁离子浓度、退火温度、引物浓度分别进行荧光定量 PCR, 最终得出最佳反应条件。结果 为保证扩增效率且无非特异性扩增, 最终选择最佳条件是: Mg^{2+} 浓度 3.0 mmol/L; 退火温度 60 °C; 引物浓度 0.3 mmol/L。结论 确立了双重分子信标实验的最优条件, 从而保证了分子信标荧光定量 PCR 检测结核杆菌具有操作简便、快速、灵敏度高(最低可检测 1 CFU/mL)、特异性强(只能检测包括耐药菌株的结核杆菌复合群)、重复性好(变异系数 $<5\%$)等优势, 为双重分子信标检测结核杆菌提供了必要条件。

关键词: 结核杆菌; 微菌落; 分子信标; 体系优化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.09.002

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2018)09-1029-05

文献标识码: A

To optimize dual molecular beacon detection system for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis*^{*}

YU Chuanxing¹, ZHANG Huan^{2#}, HUANG Mingxiang^{3#}, ZHAO Ziyun², ZHU Ling^{2△}

(1. Internal Medicine of Second People's Hospital of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350003, China;

2. Immunology Department and Center of Neuroscience, Fujian Medical

University, Fuzhou, Fujian 350004, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Fuzhou

Pulmonary Hospital of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350008, China)

Abstract: **Objective** To optimize the experimental system of dual molecular beacon to rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis* and its resistant strains. **Methods** Fluorescence quantitative PCR was carried out by selecting different magnesium ion concentration, annealing temperature and primer concentration respectively. Finally, the optimum reaction conditions were obtained. **Results** In order to ensure the efficiency of amplification and no non-specific amplification, the final selection of the best conditions were as follows, the concentration of Mg^{2+} was 3.0 mmol/L, annealing temperature was 60 °C, and the concentration of primers was 0.3 mmol/L. **Conclusion** The optimal condition of dual molecular beacon experiment was established, which ensured that the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular beacon quantitative PCR had the advantages, such as simple operation, rapid speed, high sensitivity (the minimum detection limit was 1 CFU/mL) and specificity (only *Mycobacterium tuberculosis* complex including drug-resistant strains could be detected), good reproducibility (coefficient of variation was $<5\%$) and other advantages. The study provides the necessary conditions for the dual molecular beacon detection of *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; microcolony; molecular beacon; system optimization

结核病是一个主要的公共卫生问题,特别是在发展中国家,多药耐药菌株的分枝杆菌结核病(MDR-TB)已造成了严重的健康危害^[1-3];加上结核菌耐药性的常规检测缓慢而繁琐^[4],结核菌的 BACTEC MGIT 960 液体培养系统虽然缩短了检测时间,但由于设备昂贵并且要求较高限制了其在临床的推广和应

用^[5-6]。近年来,用基因扩增方式检测结核杆菌显示出很高的灵敏度和特异度,所以 PCR 作为一种简便高效的基因扩增技术^[7-10],已成为结核病分子诊断的常用工具,但在大批量的临床应用中,PCR 作为一种诊断手段仍然存在一定的假阳性和假阴性^[11]。

分子信标技术由 TYAGI 等^[12]于 1998 年建立。

^{*} 基金项目:福建省社会发展引导性重点项目(2014Y0058);国家卫生计生委共建科学研究基金——第四轮福建省卫生教育联合攻关计划项目(WKJ2016-2-32)。 作者简介:余传星,男,主任医师,主要从事呼吸内科临床研究。 # 共同第一作者。 △ 通信作者, E-mail: ling-zhu29@sina.com。

分子信标技术由荧光能量传递(FRET)技术和线性探针杂交技术改进发展而来。分子信标是由一个环部和一个茎部组成的茎环结构 DNA 分子探针。在 PCR 循环的变性阶段,分子信标的茎部打开,茎环状结构变成线性结构,因荧光素与荧光淬灭基团分开而不能进行 FRET,发出荧光。当 PCR 循环进行到退火阶段时,若体系中存在与探针完全互补的靶序列则发生杂交反应,结果使分子信标的 5'端和 3'端分离,淬灭基团对荧光基团的淬灭作用消失,从而激发出荧光。当不存在退火时探针因茎部的作用恢复。

本研究中是将微菌落培养方法与分子生物学方法相结合^[13-14],先将待检测样本接种于培养基中的微菌落薄膜表面,用 L 型玻棒涂匀同时培养多张膜,置 37℃、5%CO₂ 的培养箱 14 h 后,显微镜下观察细菌形态,然后将长有细菌的微菌落薄膜用无菌镊子轻轻取下并提取 DNA;再使用分子信标探针进行 PCR 扩增。所以笔者首先对双重分子信标的实验体系进行了优化。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 结核分枝杆菌 H37Ra 标准株(ATCC:25177),堪萨斯分枝杆菌标准株(ATCC:12478),购自美国 ATCC 公司。

1.2 仪器与试剂 使用的仪器包括荧光定量 PCR 仪(QuantStudio6,美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、Microfuge 22R 型高速离心机(美国贝克曼库尔特公司)、优普超纯水机(英国 UP 公司)、NANO-DROP 2000 型超微量核酸蛋白检测仪(美国赛默飞世尔科技公司)。试剂中的 Gold Taq DNA 聚合酶、10×缓冲液、dNTP(2.5 mmol/L)、MgCl₂(25 mmol/L)及所用引物和分子信标均由上海闪晶生物技术公司合成。在 P2 实验室进行实验。

1.3 引物和分子信标序列 上游引物(TB IS6110f):5'-GCC TAC GTG GCC TTT GTC-3';下游引物(TB IS6110r):5'-GGT CCA GAT GGC TTG CTC-3';分子信标(TB IS6110probe):5'-hex+GCG ACA CGC CTA CGC TCG CAG GAT CCT GTC GC+dabcyl-3';上游引物(TbrpoB f):5'-CAA GGA GTT CTT CGG CAC C-3';下游引物(TbrpoB r):5'-AGC CGA TCA GAC CGA TGT T-3';分子信标(TbrpoB probe):5'-fam+CCA GCG TCC GCG ACG TGC ACC CGC GCT GG+dabcyl-3'。

1.4 方法

1.4.1 Mg²⁺ 浓度的优化 Mg²⁺ 从 25 mmol/L MgCl₂ 贮存液中逐一加入反应管中,以 1 mmol/L 递增(1、2、3……8 mmol/L),在确定了 Mg²⁺ 大致浓度以后,再在该浓度上下,以 0.5 mmol/L 递增和递减几个浓度来精确确定 Mg²⁺ 的最适浓度。反应体系为 25.0 μL:上、下游引物各 0.2 μL,分子信标 0.1 μL, Taq 酶(1.5 U/μL)1 μL,检测模板 2.0 μL,dNTP(各

2.5 mmol/L) 2.0 μL,10×Buffer 2.5 μL。反应条件为:95℃变性 15 min;95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,在 60℃读取荧光信号,反应结束后应用荧光定量 PCR 软件分析实验结果。每个标本检测 3 次取平均值。

1.4.2 引物浓度的优化 引物加入体积应该在 0.2~0.5 μL 之间进行优化,按 0.2、0.3、0.4、0.5 μL 这 4 种加入体积进行实验。

1.4.3 退火温度的优化 影响探针检测效果的因素有很多,如退火温度,Mg²⁺ 浓度,扩增程序等。据文献报道,分子信标的检测受退火温度的影响较大^[15],在最佳退火温度下,分子信标的检测能准确区分无靶基因、靶基因突变和正常靶基因,而在非最佳退火温度下,探针检测的非特异性增加。本研究以 H37Ra 标准株为阳性对照,以临床分离的异烟肼(INH)敏感菌株(分离号 1085)、结核杆菌耐药菌株(临床分离的 1146 及 1163 菌株)为实验菌株,非结核杆菌堪萨斯分枝杆菌为阴性对照,ddH₂O 为空白对照,以探针引物设计的理论退火温度 62℃为参考,从 64、62、60、58、56、54℃6 个温度中筛选出最佳退火温度。

1.5 统计学处理 数据处理采用 SPSS16.0 统计学软件,计数资料的组间比较采用 F 检验,计量资料的组间比较采用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mg²⁺ 浓度的优化

2.1.1 rpoB 分子信标检测的优化 各 Mg²⁺ 浓度条件下,检测得到的阈值循环数(Ct)值差异无统计学意义(P>0.05),为了保证扩增效率又没有非特异性扩增,最终选择检测的变异系数最小的 Mg²⁺ 浓度,即 2.5 mmol/L 作为工作浓度,见表 1。

表 1 rpoB 分子信标 Mg²⁺ 浓度优化

Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L)	Ct 值		变异系数 (%)
	均值	标准差	
1.5	16.783	0.3538	2.11
2.0	16.363	0.1846	1.13
2.5	15.863	0.1702	1.07
3.0	16.051	0.2251	1.40
3.5	15.223	0.4438	2.92
4.0	16.323	0.7168	4.39
4.5	16.755	0.5650	3.37

2.1.2 IS6110 分子信标检测的优化 在 Mg²⁺ 浓度为 1.5~4.0 mmol/L 的 6 种浓度条件下,检测得到的 Ct 值差异无统计学意义(P>0.05)。Mg²⁺ 浓度在 2.5 mmol/L 时,两对引物扩增,变异系数最小,当双重 PCR 时,为了保证扩增效率应该使其浓度高一些,本实验采用的 Mg²⁺ 浓度为 3.0 mmol/L,见表 2。

2.2 引物浓度的优化

2.2.1 rpoB 引物浓度的优化 引物浓度选择为上、下游引物加入体积均为 0.3 μL,见表 3。

表 2 IS6110 分子信标 Mg²⁺ 浓度优化结果

Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L)	Ct 值		变异系数 (%)
	均值	标准差	
1.5	19.136	0.557	2.91
2.0	18.758	0.570	3.04
2.5	18.886	0.048	0.26
3.0	19.209	0.623	3.24
3.5	19.923	0.594	2.98
4.0	19.821	0.450	2.27
4.5	20.816	0.360	1.73

表 3 rpoB 分子信标引物浓度优化结果

引物加入体积 (上游引物~下游引物,μL)	Ct 值		变异系数 (%)
	平均值	标准差	
0.2~0.2	17.350	0.894	5.15
0.2~0.3	17.126	0.493	2.88
0.2~0.4	18.339	1.588	8.66
0.2~0.5	17.142	0.269	1.57
0.3~0.2	17.085	0.502	2.94
0.3~0.3	16.989	0.160	0.94
0.3~0.4	17.447	0.464	2.66
0.3~0.5	17.618	0.351	1.99
0.4~0.2	17.460	0.389	2.23
0.4~0.3	16.239	0.454	2.79
0.4~0.4	17.511	0.521	2.97
0.4~0.5	16.886	0.916	5.43
0.5~0.2	16.246	0.316	1.94
0.5~0.3	16.867	0.261	1.55
0.5~0.4	20.116	4.934	24.53
0.5~0.5	18.273	1.060	5.80

2.2.2 IS6110 引物浓度的优化 最终选择两对引物加入体积均为 0.3 μL,见表 4。

表 4 IS6110 分子信标引物浓度优化结果

引物加入体积 (上游引物~下游引物,μL)	Ct 值		变异系数 (%)
	平均值	标准差	
0.2~0.2	19.743	0.214	1.09
0.3~0.2	20.000	0.197	0.98
0.4~0.2	20.462	0.156	0.76
0.5~0.2	20.740	0.258	1.25
0.2~0.3	19.158	0.329	1.71
0.3~0.3	19.975	0.096	0.48
0.4~0.3	19.344	0.349	1.80
0.5~0.3	20.372	0.599	2.94

续表 4 IS6110 分子信标引物浓度优化结果

引物加入体积 (上游引物~下游引物,μL)	Ct 值		变异系数 (%)
	平均值	标准差	
0.2~0.4	19.358	0.513	2.65
0.3~0.4	19.819	0.274	1.38
0.4~0.4	20.201	0.439	2.17
0.5~0.4	20.279	0.304	1.50
0.2~0.5	19.293	0.362	1.88
0.3~0.5	19.456	0.355	1.82
0.4~0.5	20.478	0.233	1.14
0.5~0.5	20.183	0.437	2.16

2.3 退火温度的优化结果

2.3.1 rpoB 分子信标检测优化 当退火温度为 55.0~60.6 ℃的各温度时,Ct 值比较差异无统计学意义($P>0.05$)。为了保证扩增效率又没有非特异性扩增,选择退火温度为 58.0~60.0 ℃,见表 5。

表 5 rpoB 分子信标退火温度的优化

退火温度 (℃)	Ct 值		变异系数 (%)
	均值	标准差	
54.0	18.568	0.928	5.00
54.3	17.452	0.048	0.27
55.0	16.505	0.067	0.40
55.8	16.302	0.188	1.15
57.1	16.115	0.166	1.03
58.8	16.598	0.121	0.73
60.6	15.870	0.173	1.09
62.2	17.788	0.062	0.35
63.4	17.973	0.694	3.86
64.2	17.750	0.617	3.48
64.8	18.453	0.720	3.90
65.0	19.540	0.659	3.37

2.3.2 IS6110 优化 当退火温度为 54.0~58.8 ℃的各温度时,Ct 值比较差异无统计学意义($P>0.05$)。为了保证扩增效率又没有非特异性扩增,选择 55~58 ℃之间的温度作为退火温度。综合比较了两对引物在 12 种退火温度时,两对引物扩增变异系数最小,当双重 PCR 时,为了保证扩增效率应该使其温度高一些,本实验采用 60 ℃作为退火温度,见表 6。

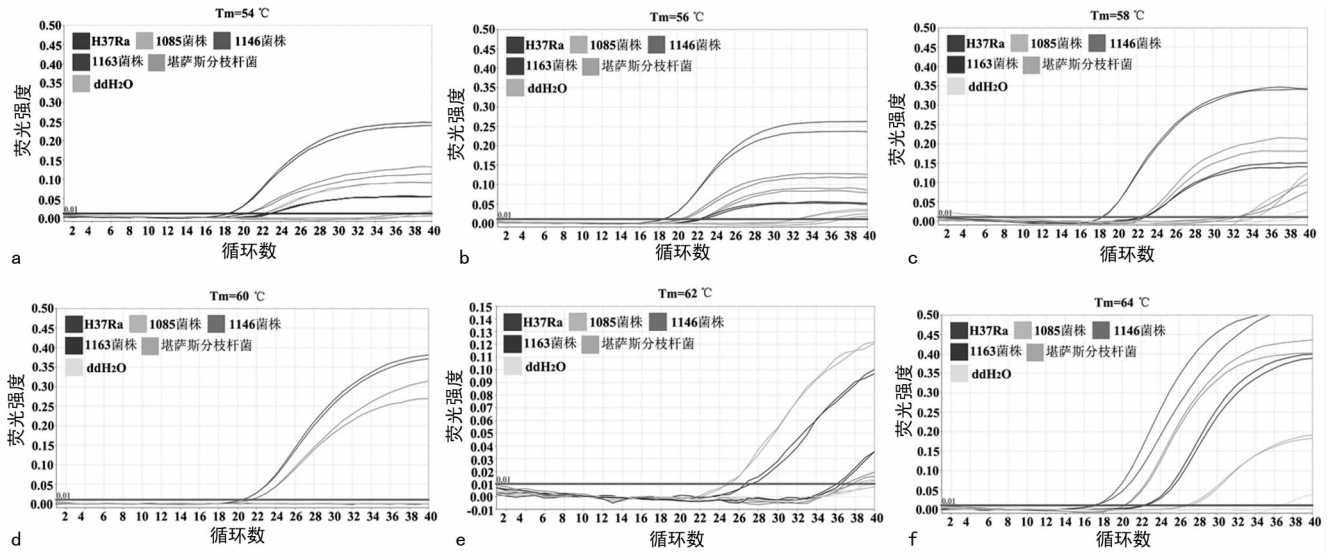
表 6 IS6110 分子信标退火温度优化结果

退火温度 (℃)	Ct 值		变异系数 (%)
	均值	标准差	
54.0	18.751	0.370	1.97
54.3	18.510	0.324	1.75
55.0	18.481	0.346	1.87

退火温度 (℃)	Ct 值		变异系数 (%)
	均值	标准差	
55.8	18.699	0.310	1.66
57.1	18.746	0.451	2.41
58.8	19.034	0.373	1.96
60.6	19.806	0.306	1.54
62.2	19.192	0.330	1.72
63.4	19.851	0.309	1.56
64.3	19.581	0.257	1.31
64.8	20.613	0.697	3.38
65.0	20.132	0.204	1.01

2.3.3 耐药基因 katG 分子信标优化 退火温度的优化实验表明当退火温度为 54、56、58、64 ℃时,野生株与耐药株均有强烈扩增信号,Ct 值<30,非结核杆

菌无扩增。2 株异烟肼敏感结核杆菌和 2 株异烟肼耐药结核杆菌的 katG 基因均有强烈的扩增曲线,对敏感菌株与耐药菌株 Ct 值进行单因素方差分析发现两组之间的扩增差异均无统计学意义($P>0.05$),这些退火温度下探针不能特异性检测 katG315 位点突变的异烟肼耐药结核杆菌,故以上退火温度非最佳。而当退火温度为 60 ℃和 62 ℃时,仅有结核杆菌野生菌株(H37Ra 标准菌株和临床分离野生菌株 1085)有强烈的扩增信号,Ct 值<30。说明仅结核杆菌野生菌株在 PCR 反应中 katG 基因有大量扩增,而结核杆菌耐药菌株(临床分离的 1146 及 1163 菌株)和非结核杆菌为弱扩增,Ct 值>30,见图 1、2。因此,退火温度为 60 ℃和 62 ℃时,katG 探针均可以有效区分结核杆菌野生菌株和耐药菌株。对敏感菌株与耐药菌株 Ct 值进行单因素方差分析发现两组之间的扩增信号差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。



注:a 表示退火温度为 54 ℃;b 表示退火温度为 56 ℃;c 表示退火温度为 58 ℃;d 表示退火温度为 60 ℃;e 表示退火温度为 62 ℃;f 表示退火温度为 64 ℃

图 1 退火温度对荧光定量 PCR 的影响

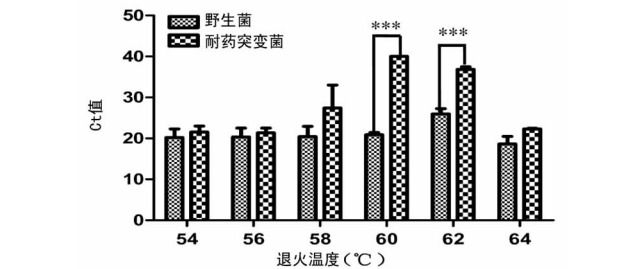


图 2 不同退火温度下结核杆菌野生菌与耐药突变菌 katG 基因扩增统计结果

当退火温度为 60 ℃时,异烟肼耐药菌株几乎无扩增,而 62 ℃时,异烟肼耐药菌株和非结核杆菌有弱扩增,见图 2。故结核杆菌异烟肼耐药菌株检测体系的最佳退火温度为 60 ℃,说明退火温度为 60 ℃时探

针能特异地检测 katG315 位点突变的结核杆菌。

3 讨 论

影响实时荧光定量 PCR 的因素包括模板 DNA、引物、dNTP、Mg²⁺ 和循环条件等,其中以退火温度、Mg²⁺ 浓度、引物和探针浓度尤为重要,它们决定了 PCR 反应的特异性^[15]。PCR 反应中,MgCl₂ 的浓度对酶的活性是至关重要的,不仅如此,合适的 MgCl₂ 浓度还能在反应中得到较低的 Ct 值(指 PCR 达到指数扩增期时,产生一定的荧光高于背景并为仪器所识别时的循环数),较高的荧光信号强度以及良好的曲线峰值。所以对其的浓度选择应慎重。引物的浓度也是一个影响 PCR 反应的关键因素,若浓度太低,会致使反应不完全,若引物太多,则发生错配以及产生

非特异产物的可能性会大大增加。退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素。变性后温度快速冷却至 40~60 ℃, 可使引物和模板发生结合。由于模板 DNA 比引物复杂得多, 引物和模板之间的碰撞结合机会远远高于模板互补链之间的碰撞。退火温度与时间, 取决于引物的长度、碱基组成及其浓度, 还有靶基序列的长度。较高的复性温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合, 提高 PCR 反应的特异性。退火温度的选择根据引物、探针的长度及 G+C 的百分比等, 较高的退火温度可大大减少引物、探针与模板的非特异性结合, 提高 PCR 反应的特异性, 但是太高会影响扩增的效率, 较低的退火温度会提高扩增效率, 但往往有非特异性扩增。在本实验中, 通过温度梯度反应, 对结果进行比较发现 58~60 ℃ 最适合, 扩增曲线最好。Mg²⁺ 浓度过高反应特异性降低, 过低则 PCR 产物量减少, 即高特异的反应条件可能与高产量的反应条件并不一致, 通过优化结果发现 3 mmol/L 时为最优, 过高或过低均影响 Ct 值及荧光信号强度。

双重荧光定量 PCR 时, 由于不同引物扩增要求有不同的最适反应条件, 除注意设计选择引物外, 应特别注意优化 PCR 反应条件^[16]。

在本实验中分别针对 IS6110, rpoB 和 katG315 的引物及分子信标探针, 先单条优化反应条件, 然后对每一个探针和引物组合在同一块反应板上同时进行靶序列的单重和多重实验比较, 看单重和多重实验是否具有相同的 Ct 值, 以及对数期是否重合, 从而认为所建立的多重 PCR 的反应条件已经达到了最佳。通过条件优化, 本研究建立的快速鉴定结核杆菌的双重分子信标检测体系达到了临床检测的要求, 并且两个分子信标序列有互补作用, 能够降低假阴性。

参考文献

- [1] GULLAND A. More cases of tuberculosis than previously thought, WHO reports[J]. BMJ, 2016, 355: i5562.
- [2] SHAH I, CHILKAR S. Clinical profile of drug resistant tuberculosis in children[J]. Indian Pediatr, 2012, 49(9): 741-744.
- [3] ELDHOLM V, MONTESERIN J, RIEUX A, et al. Four decades of transmission of a multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis outbreak strain[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7119.
- [4] DEBOOSERE N, IANTOMASI R, QUEVAL C J, et al. LppM impact on the colonization of macrophages by mycobacterium tuberculosis[J]. Cell Microbiol, 2017, 19(1):

- e12619.
- [5] DE MIRANDA S S, DE ALMEIDA I N, LOPES M L, et al. Evaluation of the commercial kit SIRE nitratase for detecting resistant mycobacterium tuberculosis in Brazil[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2017, 50(4): 550-553.
- [6] ANARGYROS P, ASTILL D S, LIM I S. Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(6): 1288-1291.
- [7] RITTER C, LUCKE K, SIRGEL F A, et al. Evaluation of the AID TB resistance line probe assay for rapid detection of genetic alterations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis strains[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(3): 940-946.
- [8] BOEHME C C, NABETA P, HILLEMANN D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1005-1015.
- [9] FAN L, ZHANG Q, CHENG L P, et al. Clinical diagnostic performance of the simultaneous amplification and testing methods for detection of the Mycobacterium tuberculosis complex for smear-negative or sputum-scarce pulmonary tuberculosis in China[J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127(10): 1863-1867.
- [10] DU J H, HUANG Z K, LUO Q, et al. Rapid diagnosis of pleural tuberculosis by Xpert MTB/RIF assay using pleural biopsy and pleural fluid specimens[J]. J Res Med Sci, 2015, 20(1): 26-31.
- [11] SOMOSKOVI A, SALFINGER M. The race is on to shorten the turnaround time for diagnosis of Multidrug-Resistant tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(12): 3715-3718.
- [12] TYAGI S, BRATU D P, KRAMER F R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(1): 49-53.
- [13] 余传星, 赵白云, 潘玉钦, 等. 荧光定量 PCR 在结核杆菌微菌落培养研究中的应用[J]. 福建中医学院学报, 2009, 19(6): 51-53.
- [14] YU C, ZHAO Z, LV J, et al. A dual molecular beacon approach for fast detection of Mycobacterium tuberculosis [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(2): 1883-1892.
- [15] HARIS S, JONES D B. Optimization of the polymerase chain reaction[J]. Br J Biomed Sci, 1997, 54(3): 166-173.
- [16] COLL F, MCNERNEY R, PRESTON M D, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences[J]. Genome Med, 2015, 7(1): 51.

(收稿日期: 2017-08-20 修回日期: 2017-10-28)