

·短篇论著·

结核分枝杆菌双重实时 RT-PCR 检测方法的研究

古莉冰¹, 朱玉兰¹, 王佃鹏², 董瑞玲^{1*}, 李微¹, 孙杰¹, 刘胜牙¹

摘要:目的 建立检测结核分枝杆菌 mRNA 表达水平的双重实时 RT-PCR 反应体系, 准确快速鉴定结核分枝杆菌。方法 根据 GenBank 上已发表的结核分枝杆菌表达 85B 抗原的 *fbpB* mRNA 基因序列, 进行对比分析, 设计合成 *fbpB* 引物和探针, 其中探针以 CY5 为报告基团, BHQ3 为淬灭基团。根据 WHO 文献报道合成人类 RNase P 基因引物和探针, 其中探针以 FAM 为报告基团, BHQ1 为淬灭基团。经条件优化后, 建立检测结核分枝杆菌 mRNA 双重实时 RT-PCR 方法, 在同一体系内同时扩增结核分枝杆菌 *fbpB* 基因和人类 RNase P 基因, 通过检测 10 份肺结核患者痰液和 10 份健康无症状人群痰液, 检验方法的特异性、重复性和检测限性。结果 肺结核患者痰液 *fbpB* 和 RNase P 基因均扩增阳性, 健康无症状人群痰液 *fbpB* 均无扩增曲线, RNase P 均扩增阳性。重复性检测显示 *fbpB* 基因重复检测的变异系数在 1% 以下, *fbpB* 检测 CT 值与痰涂片抗酸染色分枝杆菌的数量呈良好的相关性。结论 建立了一种快速双重实时 RT-PCR 方法能同时对结核分枝杆菌 *fbpB* mRNA 基因和人类 RNase P 基因进行检测, 在检测 *fbpB* mRNA 基因的同时, 通过检测 RNase P 基因监测 RNA 提取效果和 PCR 反应扩增效果。

关键词: 结核分枝杆菌; *fbpB* mRNA; RNase P; 双重实时 RT-PCR

中图分类号: R52 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)6-756-03

Measurement of *Mycobacterium tuberculosis* mRNA with duplex real-time PCR. GU Li-bing, ZHU Yu-lan, WANG Dian-peng et al. (Shenzhen International Travel Healthcare Center, Shenzhen 518033; Shenzhen Hospital for Occupational Disease Prevention and Treatment, Shenzhen 518001, P. R. China)

Abstract: Objective To establish a real-time RT-PCR method to identify *Mycobacterium tuberculosis* mRNA quickly and correctly. Methods According to the gene sequences of the *Mycobacterium tuberculosis* *fbpB* mRNA from the GenBank, primers and probe were designed. RNase P primers and probe were cited from the WHO recommendation. *FbpB* probe was labelled by CY5-BHQ3 while RNase P probe was labelled by FAM-BHQ1. The reaction condition was optimized. A duplex real-time PCR method was established to detect *fbpB* and RNase P genes accordingly. The sputum of 10 TB patients and 10 healthy controls were tested to identify the specificity, reproducibility and sensitivity of the method. Results 10 sputum from the subjects was tested positive for both *fbpB* and RNase P genes, while sputum of the controls was only positive for RNase P gene. *fbpB* mRNA reproductivity was less than 1%, and *fbpB* mRNA level was correlated to the score of acid-fast bacilli in the sputa. Conclusion This duplex real-time PCR method could detect *fbpB* mRNA and RNase P RNA simultaneously. RNase P testing could monitor RNA extraction and PCR reaction effect.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*; *fbpB* mRNA; RNase P; Duplex real-time PCR

结核杆菌信使 RNA(mRNA), 由于半衰期很短, 仅存在于活的、有代谢活性的菌体中, 因此是活动性结核的重要标志^[1-2]。本研究建立了人类 RNase P 与结核分枝杆菌 mRNA 同时扩增的双重实时荧光 PCR 方法, 在检测结核分枝杆菌 mRNA 的同时还可评估痰标本 RNA 提取和 PCR 扩增的效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本 10 份结核分枝杆菌阳性痰标本来自出入境体检人群发现的肺结核病人标本, 痰涂片抗酸染色镜检结果分别“+”、“++++”各 2 例, “++”、“+++”各

3 例。肺结核病例诊断标准和痰涂片染色镜检方法均符合卫生部 WS288-2008《肺结核诊断标准》。

1.1.2 mRNA 提取 采用天泽柱式 RNA 提取试剂盒, 0.5ml 痰液中加入 1ml 溶液 A(Trizol)和 0.2g 酸化玻璃珠, 充分振荡混匀后, 用加热振荡器 1 200 转 60℃振荡加热 5min。然后加入 0.3ml 氯仿, 12 000rpm 室温离心 5min。将上清液(约 0.6~0.8mL 的无色透明水相)缓慢吸入到干净的 1.5mL 塑料离心管中, 吸取时留下 100μL 上清液不取, 同时吸取上清时最好缓慢进行, 避免吸入交界面的不可见的丝状 DNA 和蛋白质。上清液加入等体积的溶液 B, 分两次将溶液转

作者单位: 1.深圳国际旅行卫生保健中心, 广东 深圳 518033; 2.深圳市职业病防治院, 广东 深圳 518000

作者简介: 古莉冰(1968~), 女, 本科, 主治医师, 主要从事传染病研究工作。

* 通讯作者 E-mail: xlongr1983@yahoo.com.cn

移到离心吸附柱中,12 000rpm 室温离心 1min,弃穿透液,0.5mL 通用洗柱液到离心吸附柱中,12 000rpm 室温离心 1min,洗两次,弃收集管中的穿透液。室温 12 000rpm 离心 1min,去残留的通用洗柱液,离心吸附柱转移到一自备的 RNase-free 收集管中,加入 60μL RNA 洗脱液。室温 12 000rpm 离心 1min,离心管中溶液即为 RNA 样品。

1.1.3 引物与探针 应用 ClustalW 软件对比 NCBI 数据库结核分枝杆菌 *fbpB* 基因序列,找出保守序列,并经 NCBI-Blast 分析与其他细菌和微生物间的基因无同源性序列,在此区域应用 Primer5.0 和 Primer express 软件设计引物与探针, *fbpB* 探针 5' 端标以荧光发射基因 CY5(荧光发射峰值在 667nm 处),靠近 3' 端标以荧光淬灭基团 BHQ3。RNase P 引物和探针序列来源于 WHO 推荐序列^[5]。探针引物序列见表 1。探针的 5' 端标以荧光发射基因 FAM(荧光发射峰值在 520nm 处),靠近 3' 端标以荧光淬灭基团 BHQ1。

表 1 结核分枝杆菌 mRNA 检测双重荧光 PCR 引物探针序列

Table 1 Primers and probes of *Mycobacterium tuberculosis* mRNA double real-time PCR

引物与探针 Primer and probe	序列(5'→3') Sequence	工作浓度 Concentration
<i>fbpB</i> Forward	GCACCGCCCAACTCGTT	40μM
<i>fbpB</i> Reverse	CAAGCTGGTCGCAACAACA	40μM
<i>fbpB</i> Probe (CY5)	TGCCGTTCCTCCGCAATAAACCCATAG(BHQ3)	10μM
RNase P Forward	AGATTGGACCTGCGAGCG	40μM
RNase P Reverse	GAGCGGCTGCTCCACAAGT	40μM
RNase P Probe (FAM)	TTCTGACCTGAA GGCTCTGCGCG(BHQ1)	10μM

1.2 方法

1.2.1 双重荧光 PCR 检测方法 采用 TAKARA 实时荧光定量 PCR 试剂盒(DRR064A)进行检测,经对反应条件和反应参数进行反复实验,优化结核分枝杆菌双重荧光 PCR 方法。最后确定最佳反应条件:反应总体积为 25μL,内含 2× One Step RT-PCR Buffer 12.5μL, TAKARA Ex Taq[®] HS(5U/μL)0.5μL, PrimeScript[®] RT Enzyme Mix 0.5μL, ROX Reference Dye II 0.5μL, RNase Free dH₂O 2.5μL, *fbpB* 上游引物、下游引物各 0.5μL, 探针 1.0μL, RNase P 上游引物、下游引物和探针各 0.5μL, RNA 模板 5μL。最佳反应参数为:42℃ 逆转录 8min, 95℃ 预变性 1min, 95℃ 5s, 55℃ 34s, 40 个循环。通道设置:CY5 通道 CY5 为报告基团,淬灭基团为 none; FAM 通道 FAM 为报告基团,淬灭基团为 none。选 ROX 进行荧光校正。采用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行检测,并用配备的分

析软件进行数据分析与处理。

1.2.2 特异性实验 用健康无症状人群痰标本提取 RNA 10 份进行结核分枝杆菌 mRNA 双重荧光 PCR 检测。

1.2.3 检测限性实验和 CUT OFF 值的确定 对 *fbpB* mRNA 检测出现典型扩增曲线 RNA 样本以 10 倍梯度用 DEPC 处理水进行稀释,最大稀释倍数 10⁵,然后以各稀释液为模板进行结核分枝杆菌 mRNA 双重荧光 PCR 检测,对最低稀释梯度的结核分枝杆菌 RNA 样本重复测定 RNA 4 次,统计每个样本检测 CT 平均值以确定 CUT OFF 值。

1.2.4 重复性试验 选择检测限性实验中 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 稀释后可检测到荧光信号的梯度稀释 RNA 样本,用对应的双重荧光 PCR 反应体系重复检测 3 次。统计不同稀释度的 CT 平均值和变异系数。

2 结果

2.1 肺结核患者痰标本检测结果 肺结核患者痰标本 RNA 检测均出现了典型的扩增曲线(CY5 和 FAM 通道)。*fbpB* 基因 (CY5 通道)CT 值在 25.01-34.65 之间, RNase P (FAM 通道)CT 值在 23.26-31.85 之间。

2.2 特异性的检测 健康无症状人群痰标本经双重荧光 PCR 反应检测 FAM 通道均出现了典型扩增曲线,CT 平均值为 24.04,标准差 4.21。而 CY5 通道未显现特异性曲线,特异性为 100%。

2.3 检测限性实验和 CUT OFF 值的确定 肺结核患者痰标本 RNA 随着稀释倍数的增大,检测 CT 值增大,稀释至 10⁻⁴、10⁻⁵ 均未见扩增曲线。如图 1。对肺结核患者痰标本 RNA 最低检测限稀释度重复检测三次, CY5 通道 CT 平均值为 34.81,标准差 0.57。

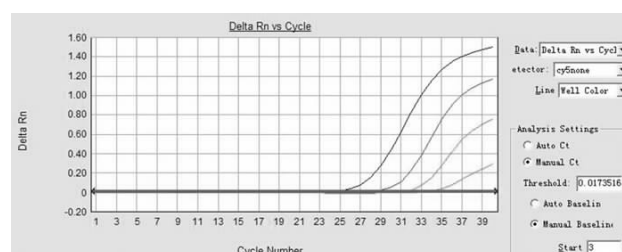


图 1 痰标本 RNA 倍比稀释双重 PCR 扩增 *fbpB* 基因检测结果,从左到右依次为原倍、10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 倍检测结果。

Fig 1 Diluted sputum RNA testing results of *fbpB* from double real-time PCR. From left to right original, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ dilution respectively.

2.4 重复性试验 选择 1 份抗酸染色为“+++”痰标本 RNA 进行原倍、10⁻¹、10⁻² 稀释重复检测三次,

fbpB 基因 CT 均值依次为 25.11、28.50、31.43, 变异系数依次为 0.16%、0.46%、0.76%, 倍比稀释的重复试验结果见图 2。

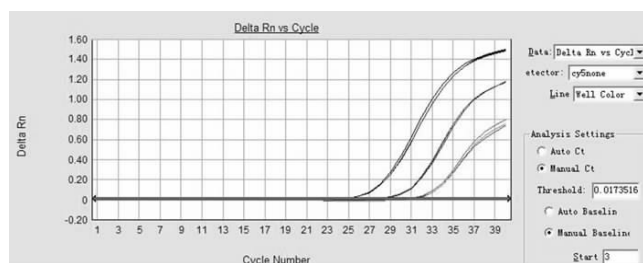


图 2 痰标本 RNA 倍比稀释重复检测 fbpB 基因扩增结果, 从左到右依次为原倍、 10^{-1} 、 10^{-2} 重复检测三次结果。

Fig 2 Fbp B reproductivity testing of diluted sputum RNA from double real-time PCR. From left to right: original; 10^{-1} ; 10^{-2} dilution respectively.

3 讨论

由于传统的结核分枝杆菌培养方法耗时较长, 分子生物学检测以灵敏性好、特异性强、检测时间短的优点, 在结核的检测中具有独特的优势。通过本研究实验证实, fbpB mRNA 基因可成功应用于活动性肺结核的检测。而且与痰液中结核分枝杆菌的数量显示了较好的相关性, 痰涂片抗酸染色为“+”的两份样本 CT 值均在 33 以上, 随着痰涂片结核分枝杆菌量的增多, 染色为“++++”的两份样本 CT 值在 25 以下。

国内外研究表明, mRNA 基因不仅在结核的诊断上具有重要意义, 同时在药物作用敏感性检测、微生物

与机体作用机制上都发挥着重要的作用。fbpB 基因表达水平可随着结核的有效化疗迅速下降^[4], 但 mRNA 基因存在量少, 不易提取的缺点。本研究采用人类基因 Rnase P 作为样本取材、RNA 提取和 PCR 反应的监测指标, 该基因探针和引物序列在 2009 年甲型 H1N1 流感检测过程中获得了较好的监测效果, 经本试验证实该双重荧光 PCR 反应体系扩展效果良好, 特异性为 100%。重复性检测 CV 值控制在 1% 以下的范围内, 可重复性好, 可广泛应用于结核分枝杆菌的检测和化疗药物敏感性监测。

参考文献:

- [1] Lu Y, Zhu LZ, Duan LS, et al. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2003, 26(7): 419-423. (In Chinese) (陆宇, 朱莉贞, 段连山, 等. mRNA 作为结核分枝杆菌活菌检测标志的可行性研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(7): 419-423.)
- [2] Hellyer T J, Desjardin L E, Teixeira L, et al. Detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* by reverse transcriptase -strand displacement amplification of mRNA [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(3): 518-523.
- [3] CDC protocol of realtime RT-PCR for influenza A(H1N1)2009.
- [4] Desjardin L E, Perkins M D, Wolski K, et al. Measurement of sputum *Mycobacterium tuberculosis* messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(1): 203-210.

收稿日期 2012-04-09 编辑: 谢永慧

(上接第 753 页)

新建的工程在设计的过程中要增加消毒设备这一项, 这样就会大幅降低微生物的污染程度, 保障饮水的安全。

农村地区饮用水卫生安全问题与农村居民健康息息相关。因此, 提高农村地区生活饮用水卫生质量是保障农村居民健康的重要手段, 同时也能够有效地提高农村地区居民的生活质量和健康水平, 促进农村地区经济和社会事业的和谐发展。

参考文献:

- [1] Standard method for inspection of drinking water GB/T5750-2006[S]. (In Chinese) (生活饮用水标准检验方法. GB/T5750-2006)
- [2] Standard for evaluation of drinking water GB57492006[S]. (In Chinese)

(生活饮用水评价标准. GB5749-2006.)

- [3] Wang CY, Li XJ, Chen CY, et al. Report on monitoring of rural drinking water in Hainan Province in 2009[J]. China Trop Med, 2010, 10(8): 1034-1035. (In Chinese) (王朝影, 李秀娟, 陈彩云, 等. 2009 年海南省农村生活饮用水监测报告[J]. 中国热带医学, 2010, 10(8): 1034-1035.)
- [4] Wang S, Cheng XY, Li XJ, et al. Monitoring of water quality of drinking water safety project in rural areas in Hainan Province in 2009[J]. Chin Trop Med, 2010, 10(6): 709-712. (In Chinese) (王帅, 程秀玉, 李秀娟, 等. 海南省 2009 年农村饮用水安全工程水质监测[J]. 中国热带医学, 2010, 10(6): 709-712.)
- [5] Zhong GM, Tang ZZ, Liu ZH, et al. Results of monitoring of drinking water quality in rural areas of Guangxi in 2007-2008[J]. J Environ Health, 2009, 26(4): 325-327. (In Chinese) (钟格梅, 唐振柱, 刘展华, 等. 2007-2008 年广西农村生活饮用水水质监测结果分析[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(4): 325-327.)

收稿日期 2012-01-22 编辑: 崔宜庆