文章编号:1000-5404(2009)24-2421-04

论著

运用荧光分光光度仪观测结核杆菌耐链霉素耐药 rpsL 43 密码子发夹探针液相杂交信号

陈庆海[1],华 兴[1],张 波[1],张 雪[1],黄君富[1],匡 红[2],府伟灵[1] ([1]第三军医大学西南医院检验科,重庆 400038;[2]解放军等452医院检验科,成都 610021)

摘 要:目的 设计针对结核杆菌耐链霉素(SM) rpsL 43 密码子的发夹型DNA探针,尝试运用荧光分光光度仪直接观测液相中发夹探针与 rpsL 43 密码子扩增产物杂交后荧光信号,从而检出该位点突变。**方法** 运用软件 Beacon designer 设计针对 rpsL 43 密码子的发夹探针,应用荧光分光光度仪检测 rpsL 43 密码子扩增片段与探针杂交后荧光信号,并比较扩增产物测序结果。**结果** 通过荧光分光光度仪观测到结核杆菌标准株及 SM 耐药 rpsL 43 密码子扩增产物杂交荧光信号存在显著差异;20 株 SM 耐药组与 10 株 H37RV 标准株对照组荧光信号强度比较,SM 耐药组 rpsL 43 密码子突变检出率为 70%,测序法突变检出率为 65%,发夹探针杂交法假阳性株 1 例(504S)。**结论** 应用荧光分光光度仪直接观测发夹探针液相杂交荧光信号具有简单、灵敏等优特点;rpsL 43 密码子点突变是重庆地区 SM 耐药的主要因素之一。

关键词: 发夹型 DNA 探针;SM 耐药 rpsL 43 密码子;荧光分光光度仪;液相杂交
中图法分类号: R378.911;R394.3;R446.5 **文献标识码:** A

Liquid hybridization assay for detecting rpsL 43 of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* with fluorescence spectrophotometer

CHEN Qing-hai[1], HUA Xing[1], ZHANG Bo[1], ZHANG Xue[1], HUANG Jun-fu[1], KUANG Hong[2], FU Wei-ling[1] ([1]Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]No. 452 Hospital of PLA, Chengdu 610021, China)

Abstract: Objective To design a hair clamp DNA probe of rpsL 43 from streptomycin (SM)-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and detect the liquid hybridization fluorescence signal between the amplified product of rpsL 43 and our hair clamp probe by fluorescence spectrophotometry in order to detect whether there is mutation at the site. Methods The software, Beacon designer, was used to design the hair clamp probe of rpsL 43. Fluorescence signal of hybridization between the amplified products of rpsL 43 from 20 strains isolated from Chongqing region and our probe was detected with fluorescence spectrophotometry. The sequences of the amplification products from different strains were compared. Results The difference in rpsL 43 PCR products between standard strain and SM-resistant one was very obvious when detecting the hybridization fluorescent signal by fluorescence spectrophotometer. We found fluorescent signal between our probe and the rpsL 43amplified products from the 20 SM-resistant strains and 10 H37RV standard strains. The mutation rate of SM-resistant strains was about 70% by our liquid hybridization assay, while the rate by sequencing was about 65%. Our assay found a false positive strain (504S). Conclusion Our liquid hybridization assay is easy and sensitive to detect rpsL 43 of SM-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. The mutation site of RpsL 43 is one of the main reasons to cause SM-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Chongqing region.

Key words: hair clamp probe, RpsL 43; streptomycin (SM)-resistant *Mycobacterium tuberculosis*; fluorescence spectrophotometer; liquid hybridisation

基金项目: 国家自然科学基金(30970879, 30571775);重庆市自然科学基金(CSTC 2009BB5140);重庆市计生委课题(2008-5)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970879, 30571775), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2009BB5140) and the Project of Family Planning Committee of Chongqing (2008-5)

作者简介: 陈庆海,男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事生物芯片与生物传感器、分子诊断、实验诊断学方面的研究。电话:(023)68765069, E-mail:cqh1969@yahoo.com.cn

通信作者: 府伟灵,电话:(023)68754429,E-mail:weilinfu@yahoo.com

收稿日期: 2009-04-09;**修回日期:** 2009-05-19

结核杆菌耐药株流行严重威胁着结核病治疗与防控。建立快速、敏感、简便的结核杆菌耐药株检测方法是目前国内外实验诊断学急需解决的问题,传统方法进行结核分枝杆菌药敏试验耗时烦琐,滞后于临床治疗需要;特别对广泛存在的耐药基因点突变难以准确、快速检测[1]。随着分子生物学及其相关技术的发展,一种具有茎环结构发夹型 DNA 探针(Hair clamp probe)因对单碱基检测具有很强的灵敏性和特异性而逐渐受到重视[2]。一线抗结核药物——链霉素(Streptomycin,SM)因其基因突变复杂、突变位点广受到广泛关注[3]。本研究选择结核杆菌耐链霉素主要突变位点 rpsL 43 密码子,设计相应的发夹型 DNA 探针,通过扩增及发夹探针杂交、采用荧光分光光度仪直接检测液相中杂交荧光信号,并比较测序结果,以建立一种简单、高效检测结核杆菌耐药突变位点的新技术。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 结核杆菌菌株来源 结核杆菌标准株 H37RV(ATCC 27294)来源于中国药品生物制品鉴定所;耐链霉素(SM)结核杆菌临床分离株来源于重庆市肺科医院(092\271S\852S 等共 20 株);金葡菌(对照组)来源于本科室。按全国结核病细菌学检验标准化规程进行分支杆菌培养(Roch 培养基)、菌种鉴定和药敏试验。灭活条件:85 ℃,1 h。

1.1.2 菌株基因组 DNA 提取 采用 Tiangen 公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,结核杆菌标准株和耐链霉素(SM)结核杆菌菌株 DNA 提取后置 -20 ℃冰箱中备用。

1.1.3 主要仪器 荧光分光光度计:F2500 Fluorescence Spectrophotometer。热循环仪(GeneAmp PCR System 2700 型);凝胶成像分析仪:Bio-Profic(Vilber Lourmat,France);FX-DY-25 型电泳仪。

1.1.4 引物及发夹型 DNA 探针设计、合成 经文献查询,选择结核杆菌包含 SM 耐药 rpsL 43 密码子序列作模板设计对象。登陆 GenBank,找到结核分枝杆菌 rpsL 43Codon 序列,在 Primer Premier V5.0 软件上设计结核合杆菌特异性引物。经 NCBI BLAST 比对验证。发夹型 DNA 探针设计软件:采用 Beacon designer 软件进行。引物 rpsL 43Codon-1:5′-TCGTCGGGACAAGATCAGTA-3′;引物 rpsL 43Codon-2:5′-ACCTGACTCGTCAACTTCAC-3′。

发夹型 DNA 探针 rpsL 43Codon-HP:5/-FAM-CGTGAGCGAGTTCGGCTTCTTCGGAGTCTCACG -DABCYL-3/。由上海生工生物科技有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 20 株结核杆菌临床分离株包含 rpsL 43 密码子片段扩增 50 μl 反应体系:PCR Buffer 5 μl、dNTP(0.4 mmol/L)0.5 μl、$MgCl_2$ 10 μl、引物 rpsL 43Codon-1 (2OD/40 μl)0.5 μl、引物 rpsL 43Codon-2(2OD/40 μl)0.5 μl、模板(含 H37RV 或 SM 菌株 092S\184S\852S 等,100 mmol/L)2 μl、ddH_2O 32.5 μl、*Taq*E 1 μl。上述组份混合液建立 50 μl 的反应体系。扩增条件:热循环仪(GeneAmp PCR System 2700 型)94 ℃预变性 5 min 后,按 94 ℃ 30 s,55 ℃ 1 min 和 72 ℃ 1 min 运行 35 个循环,94 ℃变性 30 s 后,于 65 ℃退火 1 min 结束。2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察扩增效果。

1.2.2 PCR 仪上发夹探针 rpsL 43 Codon-HP 杂交 上述反应体系加入发夹探针 rpsL 43Codon-HP(100 mmol/L)2 μl,94 ℃ 变性 5 min,45 ℃杂交 10 h,迅速置冰浴备用。

1.2.3 荧光分光光度仪液相观测 实验步骤:荧光分光光度仪的石英比色器最低体积要求为 1 ml,标本作稀释:25 μl MB-PCR 标本 +975 μl 无菌三蒸水。采用荧光分光光度计,选择激发波长 494 nm,发射波长 522 nm。开盖放入比色杯空白调零。以 1 ml 无菌 ddH_2O 测定做空白对照。标本编号,做荧光定量检测。保存实验数据取出比色杯,清洗。

1.2.4 20 株临床耐药分离株扩增产物测序 20 株结核杆菌临床分离株包含 rpsL 43 密码子扩增产物由上海生工生物科技有限公司测序(扩增按 1.2.1 方案,不加入发夹探针 rpsL 43Codon-HP)。

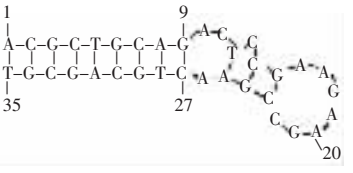
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 发夹型 DNA 探针 rpsL 43Codon-HP 二级结构预测

针对 SM rpsL 43 密码子设计发夹型 DNA 探针:rpsL 43Codon-HP(图 1)。最小自由能 -18.1 kcal/mol,具有较好的结构稳定性。经软件二级结构预测,没有找到主环以外的发夹结构,可保证杂交时的特异性。



序列"1~9"对应"35~27"为探针互补茎结构;序列"10~26"为与靶序列对应环部分

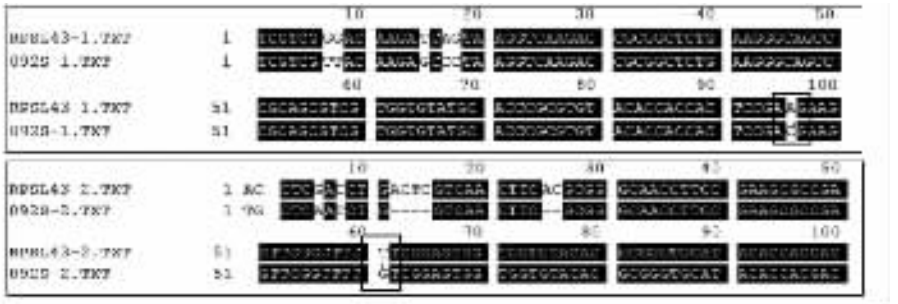
图 1 rpsL 43Codon-HP 探针设计二级结构预测

2.2 20 株结核杆菌临床分离株包含 rpsL 43 密码子扩增产物测序

20 株 TB 临床耐链霉素扩增产物测序,发现 rpsL 43 密码子位点突变 13 株:092S、271S、852 S、983R、452S、A007S、203S、043E、308S、708S、102E、59H、079RS 等,突变方式为 AAG 单碱基突变为 ACG;未发现 rpsL 43 密码子位点突变 7 株:184S、142ES、987E、541S、817RS、504S、327S 等;突变率为 65%。突变株例见图 2。

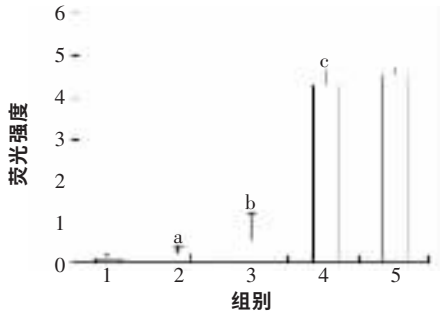
2.3 运用荧光分光光度仪检测 rpsL 43 密码子序列 PCR-发夹探针杂交结果

结果见图 3。无发夹探针空白对照组和金葡菌对照组荧光背景很低;H37RV 标准菌组荧光强度很高,相比 rpsL 43 密码子突变组具有显著性差异($P < 0.01$);rpsL43 密码子突变组荧光强度低,但由于本身带荧光素背景较无发夹探针空白对照组高($P < 0.05$);无 rpsL 43 密码子突变组荧光强度高,相比 H37RV 标准菌组没有显著性差异($P > 0.05$)。



RPSL43-1、2:TB 标准菌株 H37RV 的 rpsL 43 密码子正/反向序列(来自 GenBank);092S-1、2:TB 临床分离株 092S 的 rpsL 43 密码子扩增产物正/反向序列;上下碱基对应为白色区域说明该处碱基不同,其余黑色区域为碱基一致,框内所示为 43 密码子突变点

图 2　DNAsis 软件分析菌株 092s 的 rpsL 43 密码子扩增产物正/反向测序与标准菌株比对结果



1:无探针空白对照组; 2:金葡菌对照组; 3: rpsL 43 密码子突变组; 4: 无 rpsL 43 密码子突变组; 5: H37RV 标准菌组
a: $P<0.05$,与无探针空白对照组比较; b: $P<0.05$,与金葡菌对照组比较;c: $P<0.01$,与 rpsL43 密码子突变组比较

图 3　rpsL 43 密码子序列 PCR-发夹探针杂交液相荧光强度分析

3　讨论

结核病疫情在我国较严重,其主要原因是耐药(DR-TB)和耐多药(MDR-TB)结核病的广泛分布和迅速传播。耐药结核杆菌流行已成为结核病防治工作中迫切需要解决的问题[4-6]。链霉素是抗结核治疗中最常用的氨基糖苷类一线抗生素。SM 在全国历次结核病流行病学调查中始终居于耐药的前 2 位[7],提示临床结核杆菌 SM 耐药应引起高度重视。SM 主要作用于结核分支杆菌核糖体,抑制、干扰 mRNA 转译,抑制蛋白质合成。编码小亚基的 S12 蛋白的 rpsL 基因和编码 16S rRNA 的 rrs 基因突变是导致结核耐 SM 的主要分子机制[8,9]。常见如:rpsL 基因 43 位密码子、88 位密码子、Rrs 基因 512、513 位碱基插入等。rpsL 基因是主要突变位点, rpsL 基因 43 位密码子 AAG→AGG 突变最常见。中国不同地域耐 SM 临床分离株 rpsL 基因突变率无显著差异,文献报道突变率为 60%~90%[10];本结果测序后与标准菌株经软件双向比对(图 2):43 位密码子突变率为 65%。

传统结核药敏试验费时长(3~8 周),往往延误诊治[11]。随着分子生物学技术的快速发展,使用分子生物学方法快速检测结核杆菌的耐药性成为主要发展方向。从分子(基因)水平深入研究检测耐药位点,相对于普通药敏试验具有定位准确、信息丰富等优特点,无论是作常规耐药检测、澄清相关耐药机制及寻找新药靶点等具有重要意义。使用传统技术难以准确检测耐药结核杆菌基因突变,特别对广泛存在的耐药基因点突变检测一致是一个棘手难题。尽管测序法是公认的准确测定基因点突变的金标准,但因其复杂、昂贵、耗时长且对技术人员和操作有很高的技术要求和资职认证,不适用于一般实验室,目前主要在一些高级专业实验室才能完成,因此寻找一种简单、高效且费用相对较低的检测基因点突变分子生物学技术,并适用于普通实验室等,具有重要的现实意义。

发夹型 DNA 探针(hair clamp probe)或称分子信标、分子灯塔(molecular beacon)是一种根据核酸碱基配对原则和荧光共振能量转移(FRET)现象设计的茎环状 DNA 探针。空间结构上:环序列是与靶核酸互补的探针;茎由与靶序列无关的互补序列构成;茎的两端分别连上一个荧光分子和一个淬灭分子。荧光 FRET 现象:发夹探针呈完整茎环结构时(折叠状态),荧光分子与淬灭分子非常接近,荧光分子发出的荧光被淬灭分子吸收而荧光信号较弱(抑光态);当温度升高至变性时茎环结构打开(展开状态),荧光分子与淬灭分子分开, 淬灭抑制减弱荧光信号显著增强(发光态);温度下降茎环结构闭合,如此发夹探针随温度变化形成"展开发光态-折叠抑光态"的可逆循环。杂交温度下靶序列存在时,环序列与靶序列特异性结合扯开茎环,无靶序列则闭合至完整茎环结构,发夹型 DNA 探针这种折展状态导致"荧光释放-抑制"与温度和靶序列等高度相关。与常规核酸检测方法相比,发夹 DNA 探针以特异性更强(特别对耐药基因点突变检测)、灵敏度高和可重复使用等优点著称[12]。

本研究针对结核杆菌耐链霉素(SM)rpsL 43 密码

子设计发夹型 DNA 探针：rpsL 43Codon-HP，经软件二级结构预测，没有找到主环以外的发夹结构，可保证杂交时的特异性；最小自由能：－18.1 kcal/mol，具有较好的结构稳定性。实验证实设计的特异性发夹 DNA 探针对 rpsL 43 密码子 AAG→AGG 单碱基突变有较强的检出效果。在检测方法上我们采用常规荧光分光光度仪方法：在菌株基因组 DNA 扩增产物中加入相应发夹探针杂交，运用荧光分光光度仪直接观测液相中杂交产物的荧光信号。分析结果：①无发夹探针空白对照组由于没有荧光分子，所以荧光背景很低。②H37RV 标准菌株由于没有点突变，与发夹探针完全结合，茎环打开，荧光强度很高，相比 rpsL 43 密码子突变组具有非常显著性差异（$P<0.01$）。③rpsL43 密码子突变组与发夹探针不能结合，茎环未打开，荧光强度低，但由于本身带荧光素背景较无发夹探针空白对照组高（$P<0.05$），类似的还有金葡菌对照组。④无 rpsL 43 密码子突变组与 H37RV 标准菌株一样：与探针结合并打开茎环，荧光强度高，相比 H37RV 组（$P>0.05$）没有显著性差异。通过与测序结果对照，发夹 DNA 探针发现 1 例假阳性 504S，原因还不清楚，可能还有其他邻近位点突变干扰，其余全部符合。相对测序法的复杂、昂贵、耗时长等，常规荧光分光光度仪直接检测发夹探针与靶分子的液相杂交信号，是一种简单、快速、敏感、高效的分子检测方法，对类似 rpsL 43 密码子单碱基突变的结核耐药临床检诊具有潜在应用价值。

参考文献：

[1] Dye C, Bassili A, Bierrenbach A L, *et al*. Measuring tuberculosis burden, trends, and the impact of control programmes[J]. Lancet Infect Dis, 2008, 8(4): 233－243.

[2] Li Y, Zhou X, Ye D. Molecular beacons: an optimal multifunctional biological probe[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 373(4): 457－461.

[3] Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, *et al*. Characterisation of rpsL, rrs and embB mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Res Microbiol, 2004, 155(10): 830－834.

[4] Su W J, Feng J Y, Huang C C, *et al*. Increasing drug resistance of Mycobacterium tuberculosis isolates in a medical center in northern Taiwan[J]. J Formos Med Assoc, 2008, 107(3): 259－264.

[5] Ani A E, Idoko J, Dalyop Y B, *et al*. Drug resistance profile of Mycobacterium tuberculosis isolates from pulmonary tuberculosis patients in Jos, Nigeria[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2009, 103(1): 67－71.

[6] Wolfart M, Barth A L, Willers D, *et al*. Mycobacterium tuberculosis resistance in HIV－infected patients from a tertiary care teaching hospital in Porto Alegre, southern Brazil[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008, 102(5): 421－425.

[7] 张小刚，何秀云，李书琳，等. 结核分支杆菌耐链霉素耐药基因的检测[J]. 实用医学杂志，2001，17(10)：1006－1007.

[8] Wang F F, Zhang W H, Wang H H, *et al*. Rapid detection of rpsL gene associated with streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis by high－resolution melting analysis[J]. Int J Infect Dis, 2008, 12(3): S37－S38.

[9] 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.

[10] 黄海南，韩金祥，王进鸿，等. 链霉素耐药结核分支杆菌 rpsL 基因分析[J]. 遗传学报，2003，30(4)：376－381.

[11] 吴凤荣. 结核病实验室诊断技术进展[J]. 山西医药杂志，2007，36(1)：56－57.

[12] 陈庆海，府伟灵，薛 强，等. 发夹 DNA 探针检测乙胺丁醇耐药结核杆菌 embB 基因 306 密码子突变研究[J]. 重庆医科大学学报，2009，34(2)：135－138.

（编辑 汪勤俭）

新书推介：《医学生物学研究生常用实验技术方法》



由第三军医大学博士后陈晓红和孙仁山根据自己的研究经历主编、程天民院士题写书名和钟南山院士作序的新书《医学生物学研究生常用实验技术方法》已由四川大学出版社出版。陈晓红博士长期致力于“分子药理学与临床”研究领域。在程天民、钟南山院士等专家指导下，本书作者在医学实验方法方面积累了丰富的经验，并将经过自己摸索，并证明可行的医学实验方法总结和编撰成书，以供医学研究生参考。相信本书能成为研究生们进行科学研究的医师益友。

本书针对的读者群体为医学、药学、生物学、生物工程、生物化学及相关专业研究生和研究人员。全书共分为七章，目录如下：

第一章 动物模型的建立 第二章 组织病理学技术 第三章 超微病理学技术
第四章 细胞生物学技术 第五章 生物化学指标检测 第六章 分子生物学技术
第七章 靶向药物研究技术

联系地址：重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部（400038） **电话：**（023）68752187
联 系 人：曾 颖 **定价：**22.00 元