文章编号:1000-5404(2013)20-2155-04

论著

利用滚环扩增技术快速检测结核分枝杆菌 rpoB 基因单碱基突变

张江峰[1,2],张亚丽[2],曾照芳[2],顾大勇[3],鲁卫平[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科[1];400016 重庆,重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室[2],518045 深圳,深圳出入境检验检疫局疾病预防控制研究室[3])

[摘要] **目的** 应用滚环扩增(rolling circle amplification)技术建立对结核分枝杆菌耐药基因单碱基突变的快速检测方法。**方法** 以结核分枝杆菌利福平耐药 rpoB 基因为研究对象,设计针对该基因常见突变位点的锁式探针。通过对突变型模板、野生型模板、非结核分枝杆菌基因序列模板及不同比例的突变型模板和野生型模板混合样本的检测,研究本实验方法的特异性和灵敏度。建立特异性地检测 rpoB 基因单碱基突变的滚环扩增方法。通过对临床样本的检测并与测序结果比较,评价该方法的临床应用价值。**结果** 通过优化反应条件,应用滚环扩增技术能特异性的检测出结核分枝杆菌耐利福平 rpoB 基因的单碱基突变。通过对含有不同比例突变型模板的混合样本检测,最低能检测出 1% 突变型/野生型模板的样本。80 株临床样本的检测与测序结果一致。**结论** 滚环扩增技术特异性高、灵敏度高,无需特殊昂贵仪器且简单易操作,能够快速有效的检测出耐药结核的单碱基突变,是具有临床应用前景的方法。

[关键词] 滚环扩增;结核分枝杆菌;耐药;rpoB 基因
[中图法分类号] R378.911;R394-33;R446.9 [文献标志码] A

Detection of rpoB single base mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by rolling circle amplification

Zhang Jiangfeng[1,2], Zhang Yali[2], Zeng Zhaofang[2], Gu Dayong[3], Lu Weiping[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Disease Control and Prevention, Shenzhen International Travel Health Care Center, Shenzhen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen, Guangdong Province, 518045, China)

[**Abstract**] Objective To establish a rapid detection method of single base mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by rolling circle amplification (RCA). Methods We used rpoB gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* as the research target. Padlock probes were designed. The sensitivity and specificity of this method were evaluated by detecting mutation template, wild-type template, non-*Mycobacteria tuberculous* gene sequence template and different proportion of wild-type and mutation template mixed samples. The reaction conditions of RCA were optimized. The clinical values of the RCA method was evaluated by detecting the clinical samples and comparing the detection result with that of sequencing. Results RCA was used to detect the single base mutations of rpoB gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* specifically. We proved that RCA method could detect 1% mutation template in different proportions of mixed wild-type and mutation template samples. The detection results of clinical samples were consistent with those of the sequencing. Conclusion There are many advantages of RCA, such as high specificity, high sensitivity, no special expensive instruments and simple operation. RCA is rapid in detection of single base mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.

[**Key words**] rolling circle amplification; *Mycobacterium tuberculosis*; resistance; rpoB gene

[基金项目] 国家自然科学基金(81171667);重庆市科委攻关课题(CSTC2011AC5033);国家质检总局项目(2010IK212);深港创新圈计划联合资助项目(ZYB200907090128A);深圳市科技计划(HZ0907004)

[通信作者] 鲁卫平,电话:(023)68757607,E-mail:ronnylu@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1600.025.html(2013-06-19)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171667), the Tackling Project of Chongqing Committee of Science and Technology (CSTC2011AC5033), the Project of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2010IK212), the Hong Kong Innovation Circle Joint Project (ZYB200907090128A) and the Shenzhen Science & Technology Planning Program (HZ0907004).
Corresponding author: Lu Weiping, Tel:86-23-68757607, E-mail: ronnylu@126.com

结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis)感染引起的结核病仍是全世界范围内严重危害人民健康的最常见传染病之一。据WHO估计,在全世界的结核病患者中,约3.6%的患者存在耐多药现象[1],耐药性结核菌株的流行导致结核病疫情日益严峻[2-4]。利福平(rifampin,RFP)是传统的最主要的一线抗结核药物,通过与结核分枝杆菌rpoB基因编码的RNA聚合酶的β亚基结合抑制RNA聚合酶活性,从而阻断结核分枝杆菌RNA的合成过程而导致细菌死亡。因此,rpoB基因发生突变将引起细菌对RFP耐药。目前的研究表明,大约95%~98%利福平耐药株的rpoB基因突变发生在被称为"利福平耐药决定区"(rifampin resistance determining region,RRDR)的507~533位密码子的81 bp的热点区域,其中最常见的位点是531位点的丝氨酸突变[5-6]。

滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)技术,是借鉴自然界病原生物体的滚环式复制DNA的方式而提出的。该技术可以在恒温条件下进行核酸扩增,实现对靶物质的检测,已成功地应用于全基因组DNA检测、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)检测、核酸测序、细胞原位检测以及DNA和蛋白质芯片检测等一系列研究中[7]。本研究通过运用RCA技术检测结核分枝杆菌rpoB基因突变,以建立快速、简便、可行的耐药结核基因诊断技术。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验采用的锁式探针、引物和DNA靶序列均由大连宝生物公司合成。结核分枝杆菌利福平耐药40株及敏感40株(药物敏感性实验采用WHO推荐的比例法)均由重庆市肺科医院提供,结核分枝杆菌标准株H37Rv购自中国药品生物制品检定所。*Taq* DNA连接酶,Bst DNA聚合酶均购自NEB公司;Premix *Taq*® Version2.0, Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR ,dNTPs,核酸外切酶Ⅰ,核酸外切酶Ⅲ均购自大连宝生物公司;PCR仪(Mycycler Bio-Rad,USA);凝胶成像系统VersarDoc 1000(Bio-Rad,USA)。

1.2 方法

1.2.1 靶序列模板、锁式探针及扩增引物的设计合成 滚环扩增技术利用设计的锁式探针与相应模板互补结合,在连接酶作用下连接成环,当有错配存在时无法连接成环,保证了检测的特异性,并在引物和聚合酶存在下进行滚环扩增,当有多个引物存在时,可以形成级联放大的扩增效果。根据结核分枝杆菌标准菌株H37Rv的rpoB基因的标准序列信息(从NCBI中获得),人工合成突变型靶序列和野生型靶序列作为检测模板,锁式探针及扩增引物序列见表1。

表1 RCA所用的人工合成模板、锁式探针及扩增引物

名称	序列(5′→3′)	片段长度(bp)
野生型靶序列	GGTTG*ACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGG* *GG*CCCGG	40
突变型靶序列	GGTTG*ACCCACAAGCGCCGACTGTTGGCGCTGG* *GG*CCCGG	40
锁式探针	*ACAGTCGGCGCTTGTGGGT*TTAGTCCATTCGCAT AACGTTTCCAGCAACTAATCTCGATCAAACAGCT *CCCCAGCGCCA*	79
引物1	AGATTAGTTGCTGGAA	16
引物2	TTAGTCCATTCGCATA	16

斜体部分为锁式探针与靶序列互补结合的检测序列,斜体加粗部分为突变碱基位点

1.2.2 锁式探针的连接环化 10 μL反应体系:100 nmol/L模板1 μL、10×*Taq* DNA连接酶缓冲液1 μL、100 nmol/L锁式探针1 μL及ddH_2O 6.85 μL,95 ℃反应5 min,再加入的40 U/μL *Taq* DNA连接酶0.15 μL。65 ℃反应60 min,95 ℃反应15 min,结束后立即冰浴5 min。

1.2.3 酶切消化 向上述反应体系中加入10 μL的酶切反应液(含10×核酸外切酶Ⅰ缓冲液1 μL,10×核酸外切酶Ⅲ缓冲液1 μL,5 U/μL的核酸外切酶Ⅰ2 μL,10~30 U/μL的核酸外切酶Ⅲ0.15 μL,ddH_2O 5.85 μL),37 ℃反应3 h,最后80 ℃反应20 min。

1.2.4 RCA反应 10 μL反应体系:连接环化反应产物4 μL,10×Bst DNA聚合酶缓冲液1 μL,10 μmol/L扩增引物1和2各1 μL,10 mmol/L的dNTPs 1 μL,8 U/μL的Bst DNA聚合酶0.25 μL,ddH_2O 1.75 μL。65 ℃反应1 h。最后80 ℃反应20 min。

1.2.5 连接环化反应条件优化 利用梯度PCR仪,设定连接温度60~70 ℃以确定最适连接环化反应温度。并通过连接环化1~3 h以确定最适连接环化反应时间。反应产物进行RCA反应,产物行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.6 RCA方法特异性和灵敏度检测 同时对野生型靶序列、突变型靶序列、其他非相关基因序列以及无靶序列的反应体系进行RCA扩增,以检测该方法的特异性。以人工合成的100 nmol/L的突变型靶序列为检测模板,按突变型/野生型为0%,0.1%,1%,10%,100%比例配制样本溶液,检测该方法的灵敏度。

1.2.7 临床样本的检测 利用PCR技术扩增rpoB基因,上游引物5′-AGCGGATGACCACCCAGGAC-3′;下游引物5′-

TACACGATCTCGTCGCTAACC-3′,扩增片段覆盖突变位点所在的热点突变区域的81 bp,扩增片段长度为385 bp。扩增产物利用RCA方法检测突变位点,同时送南京金斯瑞公司测序(采用双向,以保证结果可靠性)。

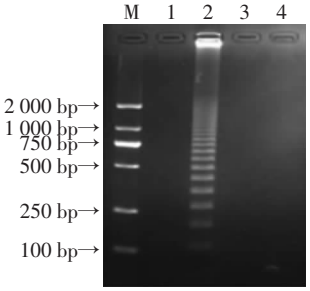
2 结果

2.1 RCA反应条件的优化

连接环化反应温度为65 ℃,反应时间1 h,可获得特异的结果,温度降低,可导致突变碱基错配,产生非特异性扩增。

2.2 RCA反应的特异性

仅有与锁式探针能互补结合并使锁式探针连接环化的突变型模板,经过RCA反应后结果明显,背景清晰,有典型的阶梯条带,电泳结果如图1。

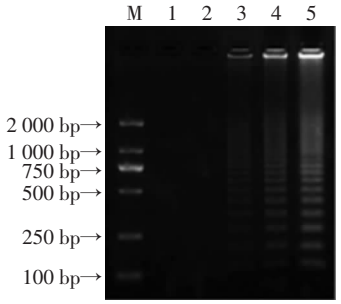


M:DL2000标准;1:野生型模板;2:突变型模板;3:非目的基因序列模板;4:无基因序列

图1 RCA反应特异性检测电泳结果

2.3 RCA反应的灵敏度

该方法最低能检测出1%的突变型,见图2。

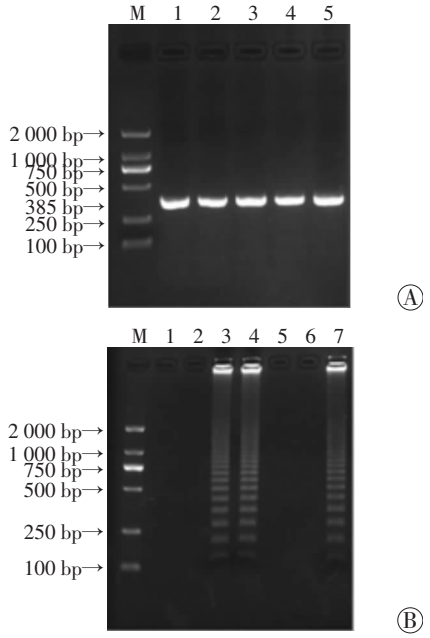


M:DL2000标准;1:0%突变型;2:0.1%突变型;3:1%突变型;4:10%突变型;5:100%突变型

图2 RCA反应灵敏度检测电泳结果

2.4 利福平耐药结核分枝杆菌临床分离株的检测

80株结核分枝杆菌临床分离株通过测序发现,26株利福平耐药株531位点突变型为C-T,突变率为65%,有14株非该位点如533位点、526位点、511位点等的基因突变及该位点非C-T突变导致结核分枝杆菌对利福平耐药。结核分枝杆菌临床分离株及标准株H37Rv的PCR扩增产物电泳结果如图3A,扩增产物片段与设计片段大小一致,而且具有很好的特异性。RCA检测结果显示,40株利福平耐药株中,26株531位点C-T突变为阳性结果,14株该位点其他类型突变和非该位点突变以及40株利福平敏感株均为阴性结果(图3)。与测序结果比较,结果一致。



A:rpoB基因(385bp)扩增结果;1、2:利福平敏感株;3、4:利福平耐药株;5:H37Rv结核分枝杆菌标准株;B:临床分离株RCA方法检测电泳结果:1、2:利福平敏感株;3、4:利福平耐药株;5:H37Rv结核分枝杆菌标准株;6:非结核分枝杆菌菌株;7:阳性对照

图3 临床样本PCR产物及RCA产物电泳结果

3 讨论

近年来,由于不规律、不合理的化学治疗,艾滋病(AIDS)的感染流行以及公共卫生监督力度不足等多种因素导致耐药性结核病逐渐增多,特别是多重耐药(multi-drug resisitant,MDR)结核病和泛耐药(extensively drug resistant,XDR)结核病的出现使结核病的控制形势更为严峻,成为结核病重燃的最重要原因之一[8-10]。利福平是主要的一线抗结核药物,结核分枝杆菌对利福平耐药,常会导致或伴随对其他抗结核药物的耐药性,因此,利福平耐药的快速诊断对耐药性结核的控制非常重要。结核分枝杆菌利福平耐药株最常见的位点是RRDR热点区域内531位点的丝氨酸突变,在该位点又以C-T的突变频率最高,大约60%左右[5-6]。因此,该突变位点的快速检测对结核分枝杆菌的耐药性判断非常关键,我们选择这个突变频率最高的位点为检测靶突变位点,并设计本实验。

传统的结核耐药性检测方法可靠但费时,一般需要数月,不能达到快速诊断的目的。随着分子诊断技术的日新月异,新的诊断技术发展迅速,但大多数先进的技术,都需要昂贵的检测仪器和试剂,这些因素限制了新技术的推广应用。因此,建立高效、准确、经济的结核耐药性检测方法具有重要意义。滚环式复制是噬

菌体中常见的DNA复制方式,这种复制形式可在恒温下扩增环状单链DNA,此基础上建立的RCA技术具有特异性高、灵敏度高和简单易操作等优势,已得到广泛应用。在对单碱基突变的检测应用中,基于一种特殊探针—锁式探针(padlock probe)又称为耳环式探针(earring probe),该探针的两端与靶核酸序列特异性互补,突变单碱基设计在3′端。扩增与靶核酸杂交连接并环化的探针,并检测相应的扩增信号。当探针与靶核酸有错配存在时,探针则无法与靶核酸连接并环化,因此保证了检测的高特异性。采用不对称方法设计锁式探针,且连接温度接近5′检测端Tm值,同时比3′检测端Tm值高约15 ℃时,可明显提高检测的特异性[11-12]。本研究设计的锁式探针总长为79 bp,5′端检测序列碱基数为19 bp,Tm值为60 ℃,3′端检测序列碱基数为11 bp,Tm值为39.6 ℃,中间的49个碱基为一段无关序列,并在无关序列中设计了一对滚环扩增引物。实验结果表明采用65 ℃进行连接环化反应,可保证检测特异性。

此外,对锁式探针连接环化所用的连接酶的选择对实验结果也有较大影响。使用T_4 DNA连接酶进行实验时,由于该酶不耐热,反应温度为37 ℃,在检测野生型模板时出现了假阳性结果,使用耐热DNA连接酶提高连接反应温度能明显提高检测特异性[13]。本实验中锁式探针连接环化采用的是*Taq* DNA连接酶为耐热连接酶,通过核酸外切酶的消化作用,提高了该方法检测特异性。另外,RCA也作为一种信号的级联放大系统,大大提高了检测方法的灵敏度,与PCR相比可以具有同等或者更高的扩增能力,这一高灵敏度特性使其能够检测到单分子水平[14]。本实验通过运用该方法对野生型和突变型不同的比例混合样本进行检测,可检测出含有1%突变型模板的样本。

目前,多重耐药性结核病和泛耐药性结核病患者逐年增加,且耐药性结核病治疗周期长,治疗药物副作用大,治愈率低,患者经济负担重,耐药性结核病的早期诊断具有重要意义。利福平是重要的一线治疗结核药物,本研究检测单位点是结核分枝杆菌利福平耐药发生率最高的位点,本研究建立的RCA技术对结核分枝杆菌耐利福平株的rpoB基因单突变进行检测,具有特异性高、灵敏度高,无需特殊昂贵仪器且简单易操作的优点。整个检测过程在数小时内就能完成,大大缩短了耐药结核的检测时间,对临床耐药结核的早期诊断和合理用药具有重要意义。

参考文献:

[1] Tan Y, Hu Z, Zhao Y, *et al*. The beginning of the rpoB gene in addition to the rifampin resistance determination region might be needed for identifying rifampin/rifabutin cross-resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Southern China [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(1): 81-85.

[2] Gumbo T. New susceptibility breakpoints for first-line antituberculosis drugs based on antimicrobial pharmacokinetic/pharmacodynamic science and population pharmacokinetic variability[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(4): 1484-1491.

[3] Gavin P, Iglesias M J, Jimenez M S, *et al*. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strain from Equatorial Guinea detected in Spain [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(11): 1858-1860.

[4] Yu C C, Chang C Y, Liu C E, *et al*. Drug resistance pattern of Mycobacterium tuberculosis copmlex at a medical center in central Taiwan, 2003-2007 [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2010, 43(4): 285-290.

[5] Musser J M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights[J]. Clin Microbiol Rev, 1995, 8(4): 496-514.

[6] Zhang Y, Yew W W. Mechamisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13(11): 1320-1330.

[7] Zhang D, Wu J, Ye F, *et al*. Amplification of circularizable probes for the detection of target nucleic acids and proteins [J]. Clin Chim Acta, 2006, 363(1/2): 61-70.

[8] Feuerriegel S, Cox H S, Zarkua N, *et al*. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(8): 3353-3356.

[9] Ferguson L A, Rhoads J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: The new face of an old disease [J]. J Am Acad Nurse Pract, 2009, 21(11): 603-609.

[10] Cohen T, Colijn C, Wright A, *et al*. Challenges in estimating the total burden of drug-resistant tuberculosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 177(12): 1302-1306.

[11] Zhang D Y, Liu B. Detection of target nucleic acids and proteins by amplification circularizable probes[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2003, 3(2): 237-248.

[12] Wang H, Kong F, Sorrell T C, *et al*. Rapid detection of ERG11 gene mutations in clinical Candida albicans isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and DNA sequencing [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 167.

[13] 贾双荣, 张可珺, 陈伟, 等. RCA技术检测甲型H1N1流感病毒耐药基因单碱基突变的应用研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2): 177-181.

[14] Steain M C, Dwyer D E, Hurt A C, *et al*. Detection of influenza A H1N1 and H3N2 mutations conferring resistance to oseltamivir using rolling circle amplification [J]. Antiviral Res, 2009, 84(3): 242-248.

(**收稿**:2013-04-10;**修回**:2013-05-11)

(编辑 邓强庭)