·论 著·

EMB基因330密码子分子DNA探针设计及荧光检测

陈庆海[1],府伟灵[1],刘春江[1],吴 蔚[1],匡 红[2] (1. 第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038;2. 解放军第452医院,四川 成都 610021)

[摘 要] **目的** 针对结核杆菌耐乙胺丁醇embB330密码子位点设计分子DNA探针,尝试运用荧光分光光度计直接观测液相中分子DNA探针与embB330密码子扩增产物杂交后的荧光信号,从而检出该位点突变。**方法** 运用软件Beacon designer设计embB基因包含330密码子的分子DNA探针,应用荧光分光光度计检测embB306密码子扩增片段与探针杂交后荧光信号,比较扩增产物测序结果。**结果** 通过荧光分光光度计观测到结核标准株及embB330密码子突变株PCR产物与探针杂交后荧光信号存在显著差异;33株耐乙胺丁醇组与10株H37RV标准株对照组荧光信号强度比较,耐乙胺丁醇组embB330密码子突变检出率为3%,测序法突变检出率为3%。**结论** 分子DNA探针技术可以有效检测embB330密码子单碱基靶点突变;应用荧光分光光度计直接观测液相荧光杂交信号简单、灵敏。

[关键词] 耐乙胺丁醇embB基因;330密码子点突变;分子DNA探针;荧光分光光度计

[中图分类号] R378.91;Q343.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2009)01-0003-03

Fluorescence detection and molecular DNA probe design of 330 codon in embB gene

CHEN Qing-hai, FU Wei-ling, LIU Chun-jiang, WU Wei, KUANG Hong(Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To design molecular DNA probe detecting embB330 codon of Ethambutol resistant mycobacterium tuberculosis (MTB), and to detect fluorescence of mutation site of embB330 codon in liquid by fluorescence spectrophotometer. **Methods** The software, beacon designer, was used to design molecular DNA probe detecting embB306 codon and detecting fluorescence signal from hybridization between the amplified product and probe by fluorescence spectrophotometer, and confer to the sequencing results. **Results** The difference between PCR products from standard strain and Ethambutol resistant one is obvious in detecting the fluorescent light by use of fluorescence microscope. We detected fluorescent light signal between the 33 Ethambutol resistant strains and 10 H37RV standard strains. The rate of resistant Ethambutol detected is about 3%, and the rate of sequencing is about 3%. **Conclusion** The technology of molecular DNA probe can effectually detect a mutation single basyl site of embB 330 codon. Fluorescence spectrophotometer have characteristics such as high sensitiveness, simple to directly detect the fluorescent light in liquid.

Keywords: Ethambutol resistant embB gene; 330 codon of mutation site; molecular DNA probe; fluorescence spectrophotometer

近年来,国内外学者在分子水平上对引起结核乙胺丁醇(Ethambutol,EMB)耐药的突变基因作了详尽的研究。研究结果表明结核杆菌embB基因306位密码子突变是耐EMB产生的主要原因,其他285、303、330密码子等突变也是引起该类耐药的重要原因[1]。针对广泛存在的单碱基突变位点不易检测,应用分子探针高灵敏直接检测单碱基突变是近年来一个重要技术发展。其中具有茎环结构分子DNA探针就是一类根据核酸碱基配对原则和荧光共振能量转移(FRET)现象而设计的DNA探针,对单碱基检测具有很高的灵敏性和特异性[2]。本研究选择结核杆菌耐乙胺丁醇一个重要突变位点embB330密码子,设计相应的分子DNA探针,通过扩增及杂交、采用荧光分光光度计观测液相杂交荧光信号,并比较测序结果,为结核杆菌耐药位点准确测定提供一种新手段。

1 材料与方法

1.1 乙胺丁醇耐药菌株、标准株来源及其基因组DNA提取

结核分枝杆菌标准株H37RV(ATCC 27294)来源于中国药品生物制品鉴定所,耐乙胺丁醇结核分枝杆菌菌株来源于重庆市肺科医院(42RE\A021E\307E等共33株),金葡菌对照组来

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571775)

[作者简介] 陈庆海(1979-),男,重庆市人,主治医师,博士,主要从事临床检验方面的研究。电话:(023)68773105

[通迅作者] 府伟灵,电话:(023)68754209, E-mail: weilinfu@yahoo.com

[收稿日期] 2008-10-11 [修回日期] 2008-11-05

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。灭活条件为:85 ℃,1 h。采用 QIANGEN 公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,耐乙胺丁醇结核分枝杆菌菌株和标准株 DNA 提取后,置 -20 ℃冰箱中备用。

1.2 主要仪器

荧光分光光度计、热循环仪(GeneAmp PCR System 2700 型)、碧云天恒温水平摇床、电泳仪、离心机等。

1.3 引物及分子 DNA 探针设计、合成

经查寻文献,选择结核杆菌耐乙胺丁醇(EMB)emb 基因包含 330 密码子突变位点的序列设计分子 DNA 探针。登陆 GenBank,找到结核杆菌耐乙胺丁醇(EMB) emb 基因包含 330 密码子突变位点序列,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。分子 DNA 探针设计软件采用 Beacon designer 软件。引物 embB306codon Primer1:5′-AGCTGGCGCACCTTCACCCT-3′,引物 embB306codon Primer2:5′-TGGCAGGCGCATCCACAGA -3′,分子 DNA 探针 TB-embB330codonMB:5′-FAM-AGTCCAGTGGAGGATCCCTTCGGCTGGACTGGACT-DABCYL-3′。引物及探针均由上海生工生物科技有限公司合成。

1.4 结核杆菌 embB330codon 序列 PCR 扩增

PCR 缓冲液 5 μL、dNTP(0.4 mmol/L) 0.5 μL、$MgCl_2$ 10 μL、引物 embB330 codon Primer1 (2 OD/40 μL) 0.5 μL、引物 embB330 codon Primer2 (2 OD/40 μL) 0.5 μL、模板(含 H37RV 或耐 EMB 菌株 42RE\A021E\307E 等,100 mmol/L) 2 μL、ddH_2O 29.5 μL、TB-embB330codonMB(100 mmol/L) 1 μL、TaqE 1 μL,上述组份混合液建立 50 μL 的反应体系。TB 分子 DNA 探针 PCR 扩增条件为:在热循环仪上 94 ℃预变性 5 min 后,按 94 ℃30 s,65 ℃ 1 min 和 72 ℃1 min 运行 35 个循环,94 ℃变性 30 s 后,72 ℃退火 1 min 结束。

1.5 荧光分光光度计的液相观测

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。打开荧光分光光度计,进入操作界面。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。

1.6 临床耐药分离株 PCR 扩增产物测序

33 株耐乙胺丁醇(EMB)结核分枝杆菌 PCR 扩增产物(扩增按以上方案,不加入 TB-embB330codonMB),产物由上海生工生物科技有限公司测序。

2 结果

分子 DNA 探针 TB-embB330 密码子 MB 二级结构预测见图 1。

运用荧光分光光度计观测 embB330 密码子序列扩增 - 分子 DNA 探针杂交结果见图 2。

结核杆菌耐乙胺丁醇临床分离株 PCR 扩增产物测序,发现 embB330codon 位点突变仅 1 株:305SRE,为 TTC→GTC;其余:605E、942ER、987E、153E、A021E、102E、409ER、075ES、292ER、85E、53E、307E、207E、42RE、553E、64RE、2ER、424SE、605ER、419SE、451ER、04RE、75RE、52SE、A79RE、708E、841ES、325E、A74E、69RE、82RE、54ER 未见 embB330codon 位点突变。突变率为 3%。305SRE 突变株测序见图 3。

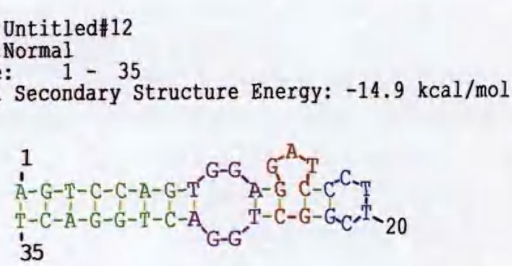


图 1 embB330codonMB 探针设计二级结构预测

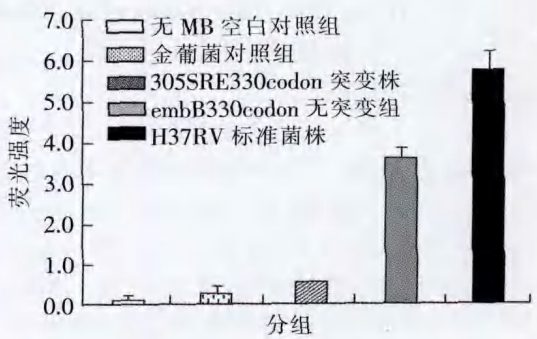
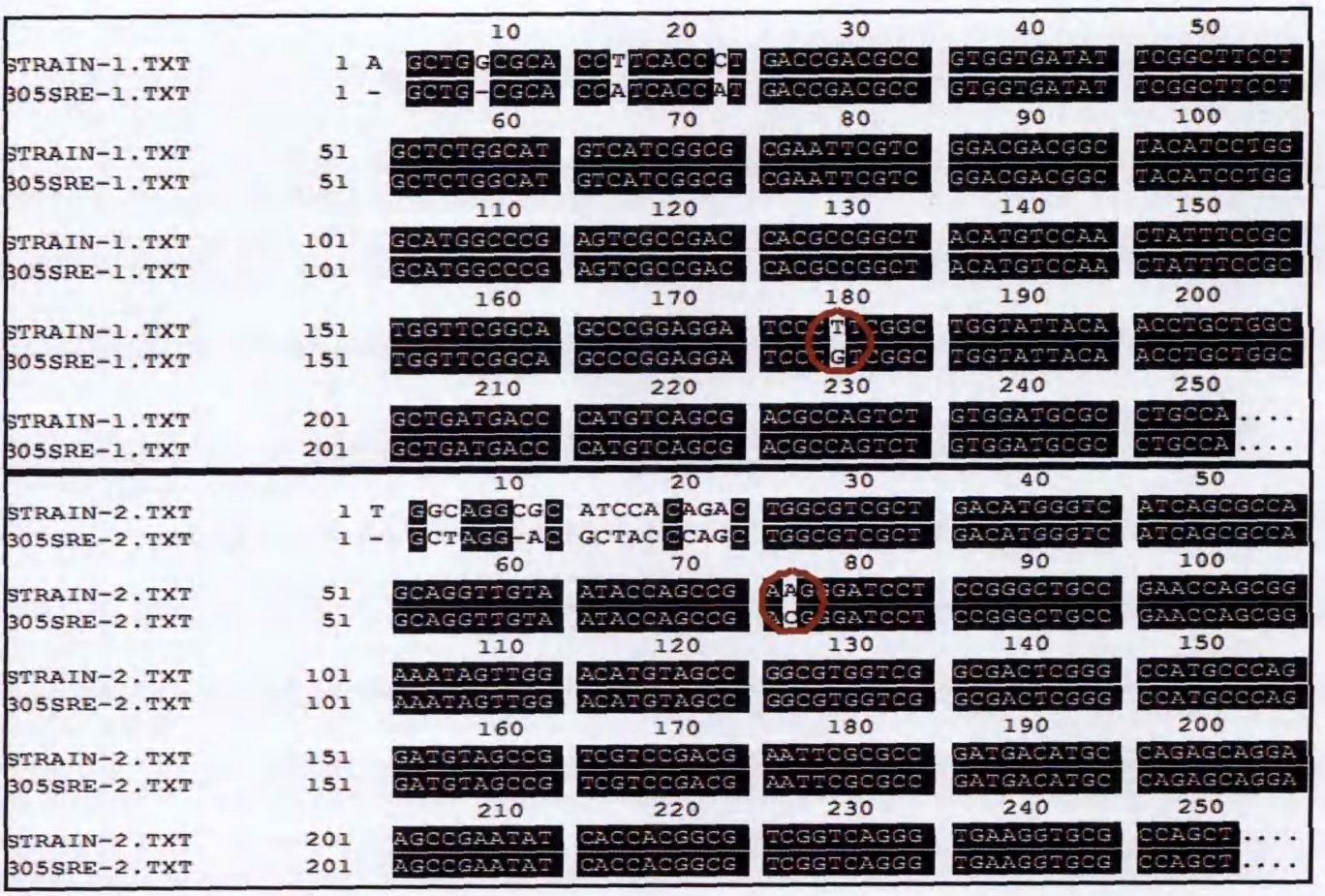


图 2 荧光分光光度计观测 embB330codon-PCR 扩增分子 DNA 探针杂交液相荧光强度对照

3 讨论

EMB 是具有广谱抗分支杆菌活性的一线抗结核合成药物,被广泛应用于结核分枝杆菌、鸟分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌等引起的结核的治疗,具有比异烟肼更广的抗菌谱。为了提高乙胺丁醇的杀菌作用,研究结核杆菌对乙胺丁醇的耐药机制,建立结核杆菌精确、快速耐药性检测方法、特别是单碱基突变的精确定位,对结核病防控具有重要的现实意义[1]。目前的研究表明结核 EMB 耐药主要由阿拉伯糖基转移酶的编码基因 embB 突变引起,embB 第 306 位甲硫氨酸密码子突变为缬氨酸最常见,此外,尚有 285、303、330 等密码子单碱基突变现象,较为复杂多样[3]。传统检测方法如培养法需时较长,且不能准确测定 EMB 耐药基因。随着分子生物学技术的发展,使用分子探针(如分子信标)准确靶向检测 DNA 突变位点,成为一种新的高灵敏检测技术[2]。



STRAIN-1、2:TB 标准菌株 H37RV 的 embB330 密码子正/反向序列(来自 GenBank);305SRE -1、2:TB 临床分离株 305SRE 的 embB-PCR 扩增产物正/反向序列;1 -20:上、下游引物段;(圈所示为 330 密码子突变点)

图 3 突变株 305SRE embB 扩增产物正/反向测序与标准菌株比对结果(DNAsis 软件分析)

本研究针对耐乙胺丁醇位点 embB330 密码子设计分子 DNA 探针,随着扩增进程,实现边扩增、分子 DNA 探针与靶 DNA 边杂交,运用荧光分光光度计直接观测液相中杂交产物的荧光信号,达到准确检测 embB330 密码子靶点的目的。空白对照组由于没有荧光素分子,所以荧光背境很低;金葡菌对照组没有相应模板及靶序列,与分子 DNA 探针无法结合,茎环不能打开,荧光强度也很低,但有一定荧光背景。305SRE 330 密码子突变株由于点突变 TTC→GTC,与分子 DNA 探针不能结合,茎环未打开,荧光强度较低,但由于有荧光素分子的存在,故有一定荧光背景;embB330 密码子无突变组与分子 DNA 探针完全结合,茎环打开,荧光强度高,但有个别为靶环其他位点突变,平均值与 H37RV 标准菌株略有不同;H37RV 标准菌株没有点突变,与分子 DNA 探针完全结合,茎环打开,荧光强度最高;对照测序结果,两者的突变检出率为 3%,说明本地区 embB330 密码子点突变占结核杆菌耐乙胺丁醇基因突变的比例较低。通过荧光分光光度计[4-5]直接观测液相中的分子 DNA 探针与靶点杂交荧光,快速鉴定部分结核杆菌耐 EMB 基因点突变,具有无须分离纯化、简单、耗时短、高效、准确等优特点。

[参考文献]

[1] Ahmad S, Mokaddas E, Jaber AA. Rapid detection of ethambutol-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by PCR-RFLP targeting embB codons 306 and 497 and iniA codon 501 mutations[J]. Mol Cell Probes, 2004, 18(5): 299 -306.

[2] Tan W, Wang K, Drake TJ. Molecular beacons[J]. Curr Opin Chem Biol, 2004, 8(5): 547 -553.

[3] Talbot EA, Kenyon TA, Mwasekaga MJ, et al. Control of anti-tuberculosis drug resistance in Botswana[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2003, 7(1): 72 -77.

[4] 苟吉庆, 李 敏, 张 锐. 利用荧光分光光度计定量分析 GFP 基因的表达水平[J]. 生物技术通报, 2001, (5): 27 -29.

[5] 张剑凯,杨聚荣,李雪鹏,等. hNaDC1 基因 5'侧翼区转录调控序列系列载体构建与鉴定[J]. 局解手术学杂志,2007,16(4):226 -228.

(编辑:文 灿)