基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0135-03

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

陈庆海[1],府伟灵[1],薛 强[1],张 雪[1],华 兴[1],匡 红[2]

(1. 第三军医大学西南医院检验科,重庆 400038;2. 解放军第 452 医院医教部,成都 610021)

【摘 要】目的:针对结核杆菌耐乙胺丁醇 embB306codon 位点,设计发夹 DNA 探针及其相应的单侧延长臂发夹 DNA 探针,建立发夹 DNA 探针芯片技术,并初步运用荧光显微镜观测探针与扩增产物杂交的荧光信号。方法:运用 Beacon designer 软件,设计 embB 基因包含 306codon 的发夹 DNA 探针及其相应的单侧延长臂发夹 DNA 探针,荧光显微镜检测 embB306codon 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:通过荧光显微镜观测到结核标准株及 embB306codon 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 embB306codon 突变检出率为 66%,测序法突变检出率为 69%。结论:embB306codon 点突变是结核杆菌耐乙胺丁醇的主要原因;发夹 DNA 探针芯片技术可以有效检测单碱基靶点突变;应用荧光显微镜可以高灵敏地观测荧光芯片杂交靶点。

【关键词】耐乙胺丁醇 embB 基因;306 密码子点突变;发夹 DNA 探针;荧光显微镜

【中国图书分类法分类号】R446.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-28

The study on detecting mutation site of 306 codon in Ethambutol resistant embB gene of *Mycobacterium* tuberculosis bacterium by hair clamp probe

CHEN Qin-hai, et al

(*Department of Medical Laboratory, Southwest Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To design hair clamp probe and the probes with single extending arm detecting embB306codon of Ethambutol resistant Mycobacterium tuberculosis bacterium (MTB), meanwhile, to design fair clamp probe chip and detecting fluorescence signal from hybridization between the amplified product and probe by fluorescence microscope. *Methods*:The software, Beacon designer, was used to design fair clamp probe and the probes with single extending arm detecting embB303codon and detecting fluorescence signal from hybridization between the amplified product and probe, and confer to the sequencing results. *Results*:The difference between PCR products from standard strain and ethambutol resistant one was obvious in detecting the fluorescent light with fluorescence microscope. We detected fluorescent light signal between the 33 ethambutol resistant strains and 10 H37RV standard strains. The rate of resistant ethambutol detected with hair clamp probe was about 66%, and the rate of sequencing was about 69%. *Conclusions*:The mutation site of embB306codon of MTB is the main reason of ethambutol resistant MTB. The technology of fair clamp DNA probe chip can effectively detect mutation of single base site. Fluorescence microscope can sensitivily detect the site of hybridization on fluorescence chip.

【Key words】Ethambutol resistant embB gene; 306 Codon of mutation site; Hair clamp probe; Fluorescence microscope

快速准确地鉴定结核分支杆菌耐药性是指导临床合理用药的前提,常规方法需时长,难以满足临床治疗需求。近年来国内外学者在基因水平上对引起结核耐药的突变基因进行了广泛研究,新的检测方法也不断涌现,如 PCR-单链构象多态性、PCR-直接测序等[1]。此外,应用分子探针直接检测单碱基突变具有灵敏度高、特异性好、可重复使用等优点。其中发夹 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(Fluores cene-resonance-energy-transfer, FRET)现象,设计的茎环结构 DNA 探针,对单碱基检测具有很高的灵敏性和特异性[2]。发夹 DNA 探针与芯片表面的结合难题是影响其在芯片技术领域运用的一个障碍。乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)作为主要的一线抗结核药物之一,其耐药情况日益严重,对

作者介绍:陈庆海(1969-),男,主治医师,博士,
研究方向:实验诊断学、生物芯片与生物传感器。

通讯作者:府伟灵,男,教授,E-mail:weilinfu@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金(30571775)。

其耐药机制的研究成为关注热点,目前已深入到分子水平研究。结核杆菌 embB 基因 306 位密码子突变是耐 EMB 产生的主要原因,其他还有 303、330密码子等[3]。本研究选择结核杆菌耐乙胺丁醇主要突变位点 embB306codon,设计相应的分子 DNA 探针及其单侧延长臂分子 DNA 探针,通过扩增及杂交、采用荧光显微镜观测杂交荧光信号,并比较测序结果,以验证该检测方法可行性,为结核杆菌耐 EMB 位点准确测定提供一种新手段; 并调查本地区 embB306codon 突变和结核杆菌耐EMB 的相关性。

1 材料与方法

1.1 耐药结核菌株、标准株来源及其基因组 DNA 提取

结核分支杆菌标准株 H37RV(ATCC 27294)来源于中国药品生物制品鉴定所,耐乙胺丁醇结核分支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。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(EMB)结核分支杆菌菌株和标准株 DNA 提取后,置 -20℃冰箱中备用。

1.2 主要仪器

荧光显微镜:BX41 荧光显微镜,奥林巴斯,日本;热循环仪(GeneAmp PCR System 2700 型);晶芯 12 围栏芯片杂交盒;碧云天恒温水平摇床;芯片点样器:Micro CAsterTM8-pin system hand Tool;电泳仪、离心机等。

1.3 引物及发夹 DNA 探针设计、合成

经文献查询,选择结核杆菌耐乙胺丁醇(EMB)emb 基因包含 306 codon 突变位点的序列设计发夹 DNA 探针。登陆 GenBank,找到结核杆菌耐乙胺丁醇(EMB) emb 基因包含 306 codon 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,扩增产物 246 bp。发夹 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';

发夹 DNA 探针 TB-embB306codonMB:

5'-FAM-AGCGACGTCGGCGACTCGGGCCATGCACGT-CGCT-DABCYL-3';

单侧延长臂发夹 DNA 探针 TB-embB306codonYCMB:

5'-FAM-AGCGACGTCGGCGACTCGGGCCATGCACGTC GCTCAGACTGATACGTGCTTCCGAC-3';

DABCLYE

embB306codonoligo(embB306codon 寡核酸探针):氨基 -5'-GTCGGAAGCACGTATCAGTCTG-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 embB306codon 序列 PCR 扩增

PCR 缓冲液 5 μl、dNTP(0.4mmol/L) 0.5 μl、$MgCl_2$ 10 μl、引物 embB306codon Primer1(2 OD/40 μl) 0.5 μl、引物 embB 306codon 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 30.5 μl、TaqE 1 μl,上述组份混合液建立 50 μl 的反应体系。TB 发夹 DNA 探针 PCR 扩增条件:在热循环仪(Gene Amp PCR System 2700 型)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, 于 72℃退火 1 min 结束。

1.5 寡核苷酸芯片制备

空白玻片清洗,浸泡于含 1%的 32- 氨基丙基三甲氧基硅烷的 95%丙酮 2 min,用丙酮洗数次,干燥,得到氨基修饰的玻片。氨基修饰的玻片浸泡于 5%的戊二醛中室温处理 30 min,水洗 2 次,室温干燥,得到醛基修饰的玻片,将 5'端氨基修饰的寡核苷酸点在醛基修饰的玻片上。点样固定 16 h 以上再加封闭剂(0.26%硼氢化钠)封闭未结合的醛基。封闭后的醛基玻片分别用 0.2%的 SDS 溶液和纯水清洗 3 次,1 min/ 次。经平板离心后室温置 1 h 自然干燥备用。

1.6 杂交及观测

1.6.1 芯片杂交及洗涤 加入 PCR 扩增产物与自制杂交液按 1∶5 混合,选择杂交温度 50℃,封闭杂交盒水浴箱中过夜(14 h)。杂交结束后,从水浴中取出,取下盖板,最后取出芯片。在 37℃的洗涤液 1 和洗涤液 2 中分别振荡洗涤 15 min × 2 次,然后置于 37℃培养箱内干燥,最后避光保存。

1.6.2 荧光显微镜观测 将芯片正面朝上放置于奥林巴斯 BX41 荧光显微镜载物台上;先以可见光找到点样点并聚焦清晰;预热荧光管后转换荧光观察,选择适宜激发波长观察点样点荧光;打开光路通道开关,在电脑桌面上打开显微镜图像记录软件 spot,选择相应参数,先预览图像后照相保存。

1.7 临床耐药分离株 PCR 扩增产物测序

33 株耐 EMB 结核分支杆菌 PCR 扩增产物 (扩增按以上方案,不加入 TB-embB306codonMB),产物由上海生工生物科技有限公司测序。

2 结 果

2.1 发夹 DNA 探针 TB- embB306codonMB 二级结构预测

见图 1。

2.2 embB306codonMB 芯片与扩增产物杂交后荧光显微镜的观测

见图 2。

2.3 耐乙胺丁醇临床耐药分离株 PCR 扩增产物测

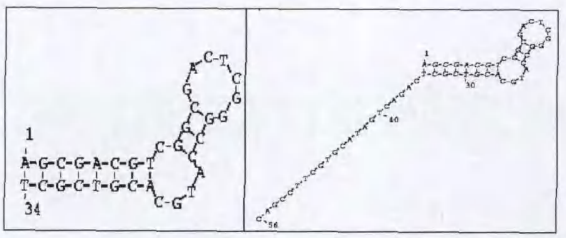


图 1 embB306codonMB；embB306codonYCMB 探针设计二级结构预测



标准株 H37RV　　embB306 突变株 72ER

相关参数：TM:45℃　14 h；bright:2.59；λ：480 nm；放大倍数：4×10

图 2 embB306codonMB 芯片杂交荧光显微镜观测结果

表 1　33 株 TB 耐乙胺丁醇临床分离株 PCR 产物 06codon 测序结果

位点		42RE	A021E	307E	325E	53E	409ER	A07	605E
embB306codon		A(G)TG	A(G)TG	A(G)TG	_	A(G)TG	A(G)TG	_	A(G)TG
位点		419SER	69RE	64RE	553E	04RE	424SE	72ER	A74E
embB306 codon		T(G)TC	_	ATG(A)	A(G)TG	_	ATG(A)	ATG(A)	_
位点	605E	52SE	451ER	075ER	75RE	54ER	85E	292ER	708E
embB306 codon	A(G)TG	_	ATG(A)	A(G)TG	_	_	A(G)TG	A(G)TG	A(G)TG
位点		841ES	82RE	102E	942ER	153E	987ER	207E	305SRE
embB306 codon		A(G)TG	_	A(G)TG	A(G)TG	A(G)TG	A(G)TG	A(G)TG	_

序

见表 1。

2.4　荧光显微镜观测 embB306codon 序列 PCR-发夹 DNA 探针扩增杂交结果

荧光图像经图像分析软件（QuantArray 软件）采取同面积光强分析法计算。Ratio=实验组（强度值-背景值）/ 阴性对照组（强度值-背景值）（结果取绝对值）。实验组 Ratio 与标准株 Ratio 比较：$P<0.05$ 的有 42RE、A021E、307E、53E、409ER、605E、419SER、553E、424SE、72ER、605E、451ER、075ER、85E、292ER、708E、841ES、102E、942ER、153E、987ER、207E。仅 1 例测序突变株 64RE 的 Ratio 与标准株 Ratio $P>0.05$，差异无统计学意义。

3　讨　论

结核病的耐药状况十分严重，已成为影响其治疗的一个难题。传统药敏试验需时数月，不能满足临床需要，建立快速、高效的结核菌药敏试验方法是目前结核控制任务中的重要问题。乙胺丁醇（EMB）[4]是 1961 年发现的一种具有广谱抗分支杆菌活性的一线抗结核合成药物，常和链霉素、异烟肼等一起联合用于治疗结核病。但其作用机制和耐药机制还不十分清楚。EMB 是一种阿拉伯糖类似物，作用于靶分子阿拉伯糖基转移酶，抑制了阿拉伯糖基聚合入阿拉伯半乳聚糖，从而影响细胞壁分枝菌酸-阿拉伯半乳聚糖-肽聚糖复合物的形成，导致菌细胞的死亡，同时也使靶分子在细胞内的药物（如利福平）更易进入细胞内，而与利福平联合应用时具有协同抗结核作用。结核菌耐 EMB 与阿拉伯糖基转移酶的编码基因 embABC 操纵子突变或 emb 蛋白过度表达有关，该操纵子由 embC、embA 和 embB 3 个基因组成，其中 embB 基因（尤其是 306 位密码子）突变是耐 EMB 产生的主要原因。针对单碱基突变现象复杂多样，使用分子探针（如发夹 DNA 探针）直接定向检测 DNA 靶点，成为又一种新的高灵敏检测技术，与常规核酸探针相比，特别对单碱基的错配、缺失或插入突变具有更高的检出率[5]。

本研究设计单侧延长臂发夹 DNA 探针采用淬灭分子中间标记，茎结构单侧（淬灭分子一侧）延长臂，可把发夹 DNA 探针高敏感性的优点运用到芯片技术上，并经软件的结构预测，未找到主环以外的发夹结构，可保证杂交时的特异性。实验证实我们设计的发夹 DNA 探针对 embB 基因 306codon 的 T→G 或 G→A 单碱基突变有较强的检出效果。采用具有更强的荧光信号识别和放大功能的荧光显微镜观测：33 株耐 EMB 与 10 株 H37RV 标准株对照组荧光信号强度比较，embB306codon 突变检出率为 66%，与测序结果仅 1 例差异。说明本文分析的 embB306codon 耐

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0138-04

海马脑片氧糖剥离模型中血晶素对脑红蛋白表达的影响

王 莉[1],余 刚[2],向德兵[3],朱 洁[2],李光勤[2]

(1. 重庆市肿瘤研究所肿瘤科,重庆 400030;2. 重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016;
3. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科,重庆 400042)

【摘 要】目的:观察血晶素(Hemin)对海马脑片氧糖剥离(Oxygen/glucose deprivation,OGD)模型的保护作用及其对脑红蛋白(Neuroglobin,Ngb)表达的影响。方法:取新生 8~10d SD 大鼠,制备厚约 400μm 海马脑片,培养 2 周后筛取完好无特异荧光着色的脑片,随机分为 3 组:正常培养对照组(HOTC),单纯缺氧缺糖组(OGD),预加 Hemin 再缺氧缺糖组(Hemin + OGD)。除 HOTC 组外,其余各组在 5%CO_2、95%N_2 的混合气体中培养 1.5 h,其后恢复培养 24 h。冰冻连续冠状切片,分别作尼氏染色、Ngb 的免疫组织化学染色。应用免疫组织化学染色和图像分析处理技术观察海马脑片 Ngb 蛋白表达,并观察神经元形态学改变。结果:OGD 组锥体细胞发生坏死,锥体细胞数量明显减少;Hemin+OGD 组坏死较前者轻,锥体细胞数较前者多。OGD 组海马脑片中形态结构正常的阳性细胞少,多数阳性神经元结构模糊、肿胀,Ngb 的表达强于 HOTC 组,二者相比有显著性差异($P<0.05$);Hemin+OGD 组海马脑片中大部分细胞形态结构正常,少数阳性神经元结构模糊、肿胀,Ngb 蛋白的表达较 HOTC 组和 OGD 组明显增强($P<0.01$)。结论:血晶素可减轻海马脑片缺糖缺氧性损伤,其机制可能与其诱导神经元表达 Ngb 密切相关。

【关键词】海马脑片;缺氧缺糖;脑红蛋白;血晶素

【中国图书分类法分类号】R741.02 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-26

Neuroprotective of neuroglobin induced by hemin in the hippocampal organotypic tissue cultures after combined oxygen/glucose deprivation

WANG Li, et al

(*Department of Medical Oncology, Chongqing Cancer Institute*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the neuroprotective role of hemin and its effect on the expression of neuroglobin in the hippocampal organotypic tissue cultures (HOTC) after combined oxygen/glucose deprivation(OGD). *Methods*: SD rats, 8~10-days old, were sacrificed for brain. HOTC were made and randomly divided into three groups: HOTC, HOTC undergoing OGD (OGD), HOTC undergoing OGD following pretreatment with hemin (Hemin + OGD). The expression of neuroglobin was detected by immunohisto-

作者介绍:王 莉(1974-),女,主治医师,博士,研究方向:信号传导。

通讯作者:余 刚,男,副教授,E-mail:yugangw@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金项目资助(NO30500170)。

药突变率略低于国外文献报道的原因[6],可能有地域差异,也说明还有其它位点耐药机制所致。通过荧光显微镜观测发夹 DNA 探针与靶点杂交技术快速鉴定部分结核分支杆菌耐 EMB 基因型,灵敏快速,从扩增到杂交结果判断仅需 1 d,对早期诊断及指导临床用药很有价值。

参 考 文 献

[1] Van Rie A, Warren R, Mshanga I, et al. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in a high-incidence community[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2):636.

[2] Bratu D P. Molecular beacons: fluorescent probes for detection of endogenous mRNAs in living cells[J]. Methods Mol Biol, 2006, 3(19):1-14.

[3] 吴雪琼.耐药性结核分枝杆菌的分子生物学研究现状[J].中华结核和呼吸杂志,2006,29(12):837-840.

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

[5] Tan W H, Wang K M. Timothy J D. Molecular beacons[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2004, 5(8):547-553.

[6] Ramaswamy S V, Amin A G, Goksel S, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44:326-336.

(责任编辑:冉明会)