

技术与方法

新型 MGB 探针在沙眼衣原体
实时 PCR 检测中的应用赵锦荣^{1)*} 白玉杰¹⁾ 王胜春²⁾ 郭晏海¹⁾ 张庆华¹⁾ 张 菊¹⁾ 阎小君¹⁾⁽¹⁾第四军医大学基因诊断研究所, 西安 710032; ⁽²⁾第四军医大学西京医院皮肤科, 西安 710032

摘要 为建立基于 TaqMan-MGB 探针的沙眼衣原体 DNA 荧光定量 PCR 检测方法, 探讨其临床应用价值, 用 PCR 法扩增沙眼衣原体隐蔽质粒 pLVG440 2 464~2 980 nt 段, 并克隆入 pMD18-T 载体用作参比模板, 设计一对引物和一个 TaqMan-MGB 探针, 优化反应条件, 建立沙眼衣原体 DNA 荧光定量 PCR 检测系统, 并运用该系统同时应用连接酶链式反应 (LCR) 法对临床标本进行检测。结果显示所建立的沙眼衣原体 DNA 荧光定量 PCR 检测系统, 最低检测限度为 1 DNA 拷贝每反应; 在 $10^0 \sim 10^9$ DNA 拷贝每反应范围内, C_t 值 (每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数) 和 DNA 拷贝数呈线性关系 ($r > 0.990$); 对临床标本检测结果同 LCR 分析结果吻合率为 100%。以上结果表明, 所建立的基于 TaqMan-MGB 探针的沙眼衣原体 DNA 荧光定量 PCR 检测系统具有敏感性高、特异性强和线性检测范围广等特点, 适用于对沙眼衣原体进行大规模筛选。

关键词 沙眼衣原体, 聚合酶链反应, 荧光定量

学科分类号 R374.1

沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, Ct) 引起的泌尿生殖道感染, 目前已成为常见的性传播疾病, 并可导致输卵管炎、盆腔炎和不孕等严重的后果。尤其是无症状或症状轻微的感染者, 由于未得到广泛的重视和彻底治疗, 使得新的感染人群不断扩大。因此对沙眼衣原体感染进行快速、灵敏、准确的诊断, 不仅可限制疾病的传播, 而且可减少不良后果的发生。近年来鉴别沙眼衣原体的金标准一直是培养法, 尽管该方法特异性高, 但检测程序费时费力, 不适于沙眼衣原体的大规模筛选。免疫技术也存在敏感性较低, 判断结果受主观因素影响较大等不足。PCR 是近年来迅速发展起来的 DNA 检测技术, 可以通过扩增沙眼衣原体内含有的质粒或染色体基因组 DNA 达到诊断目的, 具有敏感、快速等特点, 但目前常规 PCR 应用于基因诊断仍有许多局限性, 主要有两点, 一是不能准确定量, 二是由于太灵敏, 容易交叉污染, 易产生假阳性。尽管为了克服上述不足, 人们采取了许多方法, 如杂交法、竞争法、酶联法及尿苷酶降解法等, 但均不很成功, 直到最近实时荧光定量 PCR 技术的出现才使上述问题得到较好的解决。近年来的文献报道^[1~5]显示, 实时荧光定量 PCR 技术是目前最准确、重现性最好并得到国际公认的核酸分子定量和定性检测标准方法。TaqMan-MGB 探针为近期出现的新一代 TaqMan 探针, 其在实验结果的精确

性、重复性、杂交特异性等方面均优于常规 TaqMan 探针。本文运用 TaqMan-MGB 探针, 进行了建立新型沙眼衣原体 DNA 荧光定量 PCR 检测系统的探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 临床标本: 可疑标本 50 例来自西京医院皮肤科门诊, 取材时, 应将无菌拭子插入男性尿道 3~4 cm, 用力擦取; 女性需先清洁宫颈鳞柱状上皮, 然后将拭子或细胞刷伸入宫颈管内 1~2 cm, 放置 1~2 min 并转动, 作宫颈管内细胞取材。

1.1.2 仪器: DNA Engine Opticon™ 全自动荧光定量 PCR 仪购自 MJ Research 公司。

1.1.3 试剂: 热启动 Taq 酶、dNTPs、限制性内切酶 *Pst* I、*Eco*R I、X-gal、IPTG 和 pMD18-T 载体连接系统购自 TAKARA 公司。PCR 产物纯化试剂盒购自 Invitrogen 公司, 质粒提取试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 标本处理: 拭子在 1 ml 生理盐水中挤压浸泡 5 min 后弃去, 取 500 μ l 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 在沉淀中加入 800 μ l 的生理盐水洗沉淀

* 通讯联系人。

Tel: 029-3374772, E-mail: zhaojrr@163.com

收稿日期: 2002-11-19, 接受日期: 2002-12-16

1 次, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀溶入 50 μ l 处理液中 (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.8, 5 mmol/L EDTA, 0.45% Tween 20, 50 mg/L 蛋白酶 K), 充分混匀, 55 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 5 μ l 上清作为 PCR 模板。

1.2.2 连接酶链式反应 (LCR) 分析: 按说明书进行 (美国 Abbott 公司)。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析系统的建立:

a. 参比模板的构建. 选择位于沙眼衣原体隐蔽质粒 pLVG440 2 464~2 980 nt 段为参比模板, PCR 引物序列为 5' GGACAAATCGTATCTCGG 3' 和 5' GAAACCAACTCTACGCTG 3', PCR 产物回收后克隆入 pMD18-T 载体. 用 *Pst* I 和 *Eco*R I 对

重组质粒进行双酶切鉴定后进行序列测定。

b. 实时荧光 PCR 引物和 MGB 探针设计. 除遵循引物设计的基本原则外, PCR 引物和 MGB 探针的设计还应遵循以下几个基本原则: 第一, 扩增片段尽量短; 第二, 引物与探针之间的距离尽可能近, 但引物不能与探针重叠; 第三, 探针的 5' 端第一个碱基不能是 G; 第四, 引物的退火温度为 58~60 $^{\circ}$ C, 探针的退火温度为 68~70 $^{\circ}$ C. 定量检测用的引物和探针均位于参比模板内 (图 1). 正向和反向引物序列分为 5' TCAAATGACAAGCTTAGATCCGTT 3' 和 5' GCGCTACACACGCTCAAATC 3', 这对引物所扩增片段的大小为 65 bp. 荧光探针为 5' FAM-TCATACGGTTTTCCTCG-MGB 3'. TaqMan-MGB 探针的工作原理如图 2 所示。

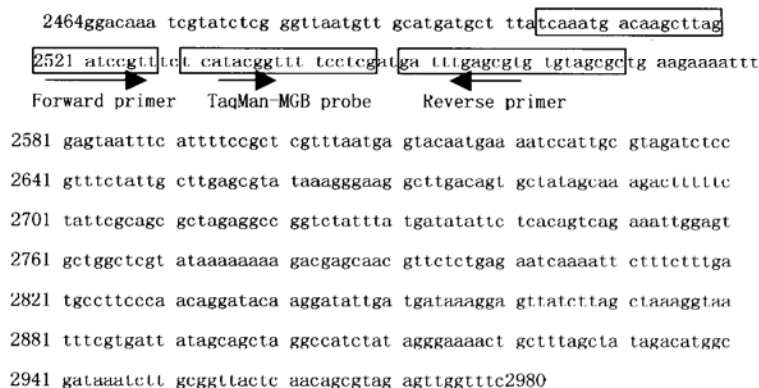


Fig. 1 Location and direction of primers and probe within template

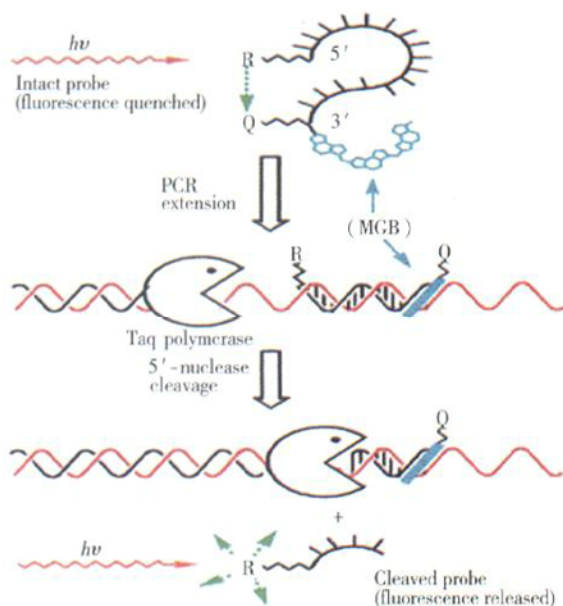


Fig. 2 Principle of real-time PCR using TaqMan-MGB probe

c. 实时荧光 PCR 反应系统相关参数确定. 关于实时荧光 PCR 循环参数及反应中引物和探针的比例等问题, 文献报道各异, 我们在总结文献报道的基础上, 以标准曲线的相关系数及检测灵敏度为准绳, 反复试验以建立最佳实时荧光 PCR 反应系统. PCR 反应的前 3~15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号. 扩增和检测均在全自动荧光定量仪 DNA Engine OpticonTM上进行。

d. 实时荧光 PCR 反应系统敏感性测试及线性标准曲线绘制. 参比模板重组质粒纯化后, 于紫外分光光度计上进行定量, 根据重组质粒的碱基长度计算其分子质量, 根据其分子质量计算其浓度, 进而计算出每毫升所含的拷贝数. 分级 10 倍稀释至 2×10^2 拷贝/ml, 分别取 5 μ l 用作荧光定量 PCR 参比模板. 在 PCR 的过程中由实时荧光定量 PCR 仪 DNA Engine OpticonTM自动绘制线性标准曲线。

1.2.4 实时荧光 PCR 反应系统的临床标本验证:
对所收集的 50 例临床标本进行荧光定量 PCR
分析.

2 结 果

2.1 参比模板重组质粒序列测定及序列分析

经在线序列相似性分析, 所克隆序列同沙眼衣原体隐蔽质粒 pLVG440 2 464~ 2 980 nt 段序列有 97% 的同源性 (505/517= 97%).

2.2 LCR

对所收集的 50 例临床标本进行 LCR 分析, 结果有 27 例为沙眼衣原体阳性.

2.3 实时荧光 PCR 反应系统相关参数确定

经反复试验所建立的反应系统为: 反应体系 50 μ l, 引物和探针浓度均为 0.4 μ mol/L, dNTPs 浓度为 0.2 mmol/L, MgCl₂ 浓度 3.5 mmol/L, 热启动 Taq 酶 1.25 U. 参比品和待测样品各加 5 μ l 用作 PCR 模板.

反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 180 s, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 循环 50 次, 最后 37 $^{\circ}$ C 保温 120 s. 在每一循环 60 $^{\circ}$ C 退火步骤读取荧光信号.

2.4 最低检测限度

所建立的实时荧光 PCR 反应系统的检测最低限度为 1 DNA 拷贝每反应.

2.5 线性检测范围

在 $10^0 \sim 10^9$ DNA 拷贝每反应范围内, C_t 值 (threshold cycle, 每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数) 和 DNA 拷贝数呈线性关系 ($r > 0.990$) (图 3 和图 4).

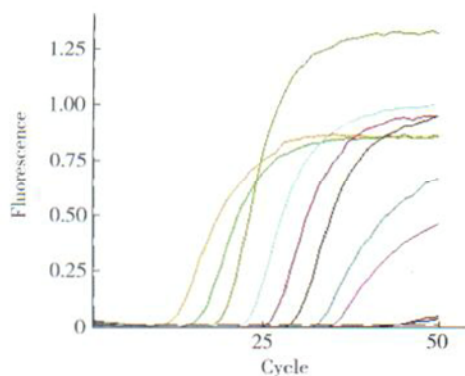


Fig 3 Amplification curves of standard template with different concentration

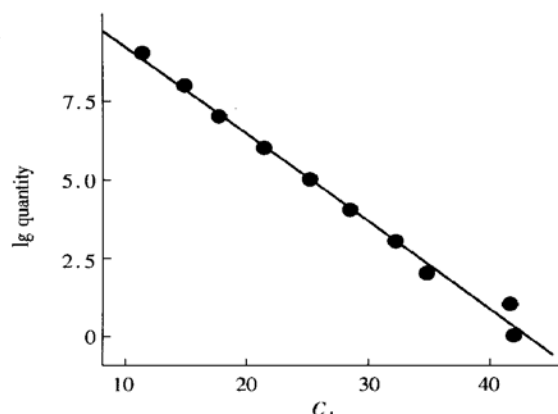


Fig. 4 Standard curve for *Chlamydia trachomatis* quantification

$$y = -0.28x + 12.04, r^2 = 0.993$$

2.6 临床标本荧光定量 PCR 检测结果

对所收集的 50 例临床标本进行荧光定量 PCR 分析, 结果有 27 例为沙眼衣原体阳性. 检测结果同 LCR 分析结果吻合率为 100%.

3 讨 论

近年来的文献报道显示, 实时荧光定量 PCR 技术是目前最准确、重现性最好并得到国际公认的核酸分子定量定性检测的标准方法, 已广泛用于基因表达研究、转基因研究, 药物疗效考核、病原体检测等诸多领域^[6~9]. 实时荧光定量 PCR 技术的基本原理是 (图 2), PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针, 该探针为一寡核苷酸, 两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团. 当探针完整时, 报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收; 随着 PCR 的进行, 当引物延伸至探针位置时, Taq 酶发挥其 5'-3' 外切活性将探针 5' 端的荧光分子从探针上切割下来, 淬灭分子失去对荧光分子的淬灭作用, 从而使荧光分子发出荧光, 切割的荧光分子数与 PCR 产物的数量成比例. 因此根据 PCR 反应液的荧光强度即可计算出初始模板的数量.

同常规 PCR 法相比, 该方法除具有常规 PCR 的优点外, 还具有以下几个优点: 一是有效解决 PCR 污染问题, 从配好 PCR 反应液到结果分析完成, 整个过程均在单管中进行, 且无需打开管盖, 避免了 PCR 产物对实验室的污染; 二是自动化程度高, PCR 反应及其后的结果分析均由计算机来完成; 三是特异性更强, 因为荧光信号的产生不仅

强烈依赖于靶模板同探针的杂交,而且同时强烈依赖于靶模板的扩增,二者缺一不可,故不存在非特异性扩增现象;四是 PCR 反应的实时监控,由于传统定量方法都是终点检测,而终点检测在靶模板浓度较高时结果并不真实(图 3),实时荧光定量 PCR 技术有效地解决了传统定量只能终点检测的局限,实现了每一轮循环均检测一次荧光信号的强度,并记录在电脑软件之中,通过对每个样品 C_t 值的计算,根据标准曲线获得定量结果;五是绝对定量,由于 C_t 值与起始模板的对数存在线性关系,可利用标准曲线对未知样品进行绝对定量测定。

已出现的荧光定量 PCR 方法有多种,其中最具有应用前景的方法是 TaqMan 探针法。目前新一代的 TaqMan 探针 TaqMan-MGB 探针已问世(Roche、Epoch)。MGB 是个三肽,其英文全称为 Minor Groove Binder (小型的凹槽结合物),它可以结合在 DNA 双螺旋的小沟里,从而起到稳定 DNA 双螺旋的作用。同常规 TaqMan 探针相比, TaqMan-MGB 探针具有如下优点:一是荧光本底低。TaqMan-MGB 探针 3' 端标记了自身不发光的淬灭荧光分子,以取代常规可发光的 Tamra 荧光标记,这一新技术使荧光本底降低。二是分辨率更高。淬灭荧光分子与报告基团在空间位置上更接近,使实验的结果更精确,分辨率更高。三是杂交特异性增强。由于探针 3' 端另结合了 Minor groove binder 结合物,使得探针的 T_m 值提高,大大增加了探针的杂交稳定性,提高了配对与非配对模板间的 T_m 值差异,使非特异性杂交显著降低。四是探针长度缩短。常规 TaqMan 探针在 AT 碱基含量较多时其探针长度将达 30~40 个碱基,而用 TaqMan-MGB 荧光探针,探针长度一般在 13~18 个碱基范围内。这一特点对 AT 含量高的序列探针的设计有很大的帮助^[10]。鉴于上述原因,在检测性能方面,基于 TaqMan-MGB 探针的荧光定量 PCR 反应系统,应优于基于 TaqMan 探针的荧光定量 PCR 反应系统。我们在实验中也证实了这一点。前者敏感度高,检测限度为 1 DNA 拷贝每反应,而后者多达不到该检测限度。另外,前者检测线性范围广,在 $10^0 \sim 10^9$ DNA 拷贝每反应范围内, C_t 值和 DNA 拷贝数呈线性关系 ($r > 0.990$),而后者线性检测范围多在 $10^1 \sim 10^8$ DNA 拷贝每反应

范围内。Fernandez 等^[11]在定量研究 HHV-7 的实验中也得出了相似结论,我们所设计的定量检测用引物所扩增片段的大小只有 65 bp,扩增片段短势必会提高反应系统的扩增效率,这可能也是促成前者检测敏感度高,检测线性范围广的有利因素之一。

所建立的新型沙眼衣原体 DNA 荧光定量 PCR 检测系统,在特异性方面也显示出了较强优势。美国 Abbott 公司研制的连接酶链反应技术,因其具有高的特异性而得到国际上的认可。我们对所收集的 50 例临床标本同时进行 LCR 分析和荧光定量检测,二者检测结果吻合率为 100%。

参 考 文 献

- 1 Heim A, Ebnet C, Harste G, *et al.* Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol*, 2003, **70** (2): 228~239
- 2 Nijhuis M, van Maarseveen N, Schuurman R, *et al.* Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2002, **40** (10): 3666~3670
- 3 Stamey F R, Patel M M, Holloway B P, *et al.* Quantitative, fluorogenic probe PCR assay for detection of human herpesvirus 8 DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 2001, **39** (10): 3537~3540
- 4 Machida U, Kami M, Fukui T, *et al.* Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol*, 2000, **38** (7): 2536~2542
- 5 Kimura H, Morita M, Yabuta Y, *et al.* Quantitative analysis of Epstein Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 1999, **37** (1): 132~136
- 6 Becker K, Pan D, Whitely C B. Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer. *Hum Gene Ther*, 1999, **10** (15): 2559~2566
- 7 Pas S D, Fries E, De Man R A, *et al.* Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J Clin Microbiol*, 2000, **38** (8): 2897~2901
- 8 Bieche I, Onody P, Laurendeau I, *et al.* Real-time reverse transcription PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem*, 1999, **45** (8-1): 1148~1156
- 9 Wang X, Li X, Currie R W, *et al.* Application of real-time polymerase chain reaction to quantitate induced expression of interleukin 1 beta mRNA in ischemic brain tolerance. *J Neurosci Res*, 2000, **59** (2): 238~246
- 10 Kutayav I V, Afonina I A, Mills A, *et al.* 3'-minor groove binder DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (2): 655~661
- 11 Fernandez C, Boutolleau D, Igor V, *et al.* Quantitation of HHV-7 genome by real-time polymerase chain reaction assay using MGB probe technology. *J Virol Methods*, 2002, **106** (1): 11

Detection of *Chlamydia trachomatis* by Real-time Polymerase Chain Reaction Using TaqMan-MGB Probe Technology

ZHAO Jir-Rong^{1)*}, BAI Yir-Jie¹⁾, WANG Sheng-Chun²⁾,
GUO Yir-Hai¹⁾, ZHANG Qing-Hua¹⁾, ZHANG Ju¹⁾, YAN Xiao-Jun¹⁾

¹⁾Institute of Genetic Diagnosis, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

²⁾Department of Dermatology and Venereology of Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract To develop a real-time PCR based on TaqMan technology using the new MGB probe for detecting *Chlamydia trachomatis* DNA, plasmid containing the sequence of interest was constructed for the standardization of the method and to assess its sensitivity. Primers and MGB probe were chosen in the conserved region of cryptic plasmid pLGV440. The Results showed that this *Chlamydia trachomatis* assay had a threshold sensitivity of one genome copy number per reaction. A linear standard curve was obtained between 10^0 and 10^9 DNA copies/reaction ($r > 0.990$). Fifty clinical specimens were tested by real-time PCR and LCR simultaneously and the coherence was 100%. These observations suggested that real-time PCR based on MGB probe was an excellent candidate for a standard *Chlamydia trachomatis* detection method in a large scale.

Key words *Chlamydia trachomatis*, polymerase chain reaction, fluorescence quantitation

* Corresponding author. Tel: 86-29-3374772, E-mail: zhaojrr@163.com

Received: November 19, 2002 Accepted: December 16, 2002

关于第三届亚洲视觉科学会议延期召开的通知

原定 2003 年 11 月 21~25 日在重庆市召开的第三届亚洲视觉科学会议 (ACV2003), 由于突发“非典”疫情, 大会组织委员会不得不决定将会议延至 2004 年召开。我们将及时通知您有关大会的进一步消息。因为会议延期给您造成诸多不便, 敬请原谅。

大会组织委员会感谢各位代表对视觉科学会议的热情支持, 并表示将竭尽全力办好 2004 年会议。如需咨询会议有关问题, 请按下面方式联系:

联系人: 魏舜仪, 吴梅英

地址: 北京朝阳区大屯路 15 号中国科学院生物物理研究所

电话: 010-64889894/64888778

传真: 010-64853625 E-mail: sb@sun5.ibp.ac.cn/lvip@sun5.ibp.ac.cn