

• 论 著 •

13 种链球菌超抗原基因的双重实时荧光 PCR 检测方法的建立*

崔淑娟, 石伟先, 张代涛, 赵家琛, 卢桂兰, 刘医萌, 梁慧洁, 彭晓旻[△], 杨 鹏, 王全意
(北京市疾病预防控制中心传染病地方病控制所, 北京 100013)

摘要:目的 建立一新的快速的链球菌超抗原基因检测方法, 能快速、灵敏及特异地分析样本中存在的各种超抗原基因。方法 根据 13 种链球菌超抗原基因的保守序列设计特异性引物和探针, 利用 13 种超抗原的阳性标本作为模板来优化了反应体系与扩增条件, 并验证其特异度与灵敏度。结果 利用该研究建立的双重实时荧光 PCR 方法体系, 可以特异性鉴定出 13 种链球菌超抗原, 并且与其他呼吸道病原菌也没有交叉反应。另外, 该检测体系的检测灵敏度高于普通 PCR 至少 1~2 个数量级(10~100 倍)及以上。结论 该研究建立的双重实时荧光 PCR 法能更加准确、快速地对链球菌菌株中的超抗原基因进行检测分析。

关键词:链球菌; 超抗原; 双重实时荧光聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)04-0441-03

Development of a duplex real-time PCR assay for detecting 13 streptococcal superantigens*

Cui Shujuan, Shi Weixian, Zhang Daitao, Zhao Jiachen, Lu Guilin, Liu Yimeng,
Liang Huijie, Peng Xiaomin[△], Yang Peng, Wang Quanyu
(Institute for Infectious Disease and Endemic Disease Control, Beijing Center for
Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective To establish a duplex real-time PCR assay for rapid, sensitive, specific detection of 13 streptococcal superantigens. **Methods** Primer and probe sequences were selected based on the highly conserved region from an alignment of nucleotide sequences of the 13 streptococcal SAGs. The reaction conditions of the duplex real-time PCR were optimized and the specificity and sensitivity of the duplex assay was evaluated using SAG positive strains. **Results** 13 SAGs were able to differentiated using the duplex assay and there was no cross-reaction with non-Streptococcus bacteria. On the other hand, the limit of detection of the duplex assay was at least one or two log dilutions higher than that of the conventional PCR. **Conclusion** The study of duplex real-time PCR assay can identified 13 streptococcal superantigens accurately and fastly.

Key words: streptococcal; superantigens; duplex real-time fluorescent polymerase chain reaction

脓链球菌(GAS)是人类最常见和重要的致病菌之一。90%的链球菌感染疾病是由 GAS 引起的^[1-2]。GAS 可以产生大量的毒力致病因子, 包括多种黏附分子和 30 余种外分泌蛋白, 如链球菌超抗原、溶细胞素、蛋白酶、DNase 和各种各样的水解酶等。目前已知 GAS 的超抗原包括 *SpeA*、*SpeC*、*SpeG*、*SpeH*、*SpeI*、*SpeJ*、*SpeL*、*SpeK*、*SpeM*、*Ssa* 和 *SmeZ*, 共有 11 种。另外, 化脓链球菌细胞外蛋白酶 *SpeB* 和 *SpeF* 也表现出超抗原的活性。超抗原是导致侵袭性链球菌感染的重要毒力因子。因此, 基于各种超抗原的研究对于链球菌的深入研究及其流行病学的研究就显得非常重要。Meisal 等^[3]建立了用普通 PCR 法对 GAS 超抗原进行分型检测, 但是由于普通 PCR 的灵敏度较低、操作繁琐而局限了该方法的应用。因此, 本课题拟建立一种全新的链球菌超抗原基因双重实时荧光 PCR 检测方法, 能够快速、灵敏及特异地鉴定 13 种超抗原基因。

1 材料与方法

1.1 标本 灵敏度检测标本: *SpeA*、*SpeC*、*SpeG*、*SpeH*、*SpeI*、*SpeJ*、*SpeL*、*SpeK*、*SpeM*、*Ssa*、*SmeZ*、*SpeB* 和 *SpeF* 阳性标本各 1 例。每个标本分别进行 10 倍梯度稀释, 每个标本共计 5 个浓度, 即原液、1:10、1:100、1:1000、1:10000 倍稀释。特异度检测标本: 肺炎支原体(MP)、流行性脑膜炎双球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌(MRSA)、B 族链球

菌(FT67)、G 族链球菌(XCN14)各 1 例。

1.2 仪器与试剂 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, 美国), 普通 PCR 仪 life Express(大和公司, 日本), 凝胶图象分析系统 BioSenSC300(上海山富科学仪器有限公司); Taq 酶(Promega, 美国)、琼脂糖(西班牙)、DNA 标记物 DL2000(TAKARA)、引物(上海英俊公司合成)等。

1.3 方法

1.3.1 核酸提取 取 100 L 标本直接加入 100 L 核酸抽提液, 充分混匀, 沸水浴 10 min, 然后 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清 4 L 作为 PCR 反应模板。

1.3.2 普通定性 PCR 利用普通 PCR 法对 13 种型别的链球菌超抗原样本的各稀释度标本以及肺炎支原体(MP)、流行性脑膜炎双球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌(MRSA)、B 族链球菌(FT67)、G 族链球菌(XCN14)进行检测, 扩增引物及反应条件见表 1^[3]。

1.3.3 双重实时荧光 PCR 根据 NCBI 上登录的 13 种超抗原的基因序列, 针对各自保守区设计特异性引物和 TaqMan 探针序列, 并由上海英俊公司合成(具体序列及组合见表 2)。检测体系(40 L)根据上海之江生物科技股份有限公司链球菌超抗原检测试剂盒的说明书进行配制, 反应条件为 94 °C 预热 2 min; 再按 93 °C 预热 15 s, 55 °C 扩增 60 s, 循环 40 次; 单点荧光

* 基金项目:北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(2013-3-098);北京市青年拔尖人才项目(2014000021223ZK36)。作者简介:崔淑娟,女,副研究员,主要从事呼吸道病原体的研究。△ 通讯作者,E-mail:pengxiaomin@bjcdc.org。

检测温度为 55 ℃。荧光通道检测选择:选用 FAM 和 VIC/HEX 双通道。Ct 值小于或等于 38 确定为阳性。

表 1 普通定性 PCR 所用引物及扩增参数

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物大小 (bp)	退火温度 (°C)
<i>SpeA</i>	上游-CCA AGC CAA CTT CAC AGA TC	356	50
	下游-CTT TAT (T/C) CTT AG(G/A)T ATG AAC		
<i>SpeB</i>	上游-CAA CCA GTT GTT AAA TCT CT	762	58
	下游-CTA AGG TTT GAT GCC TAC AA		
<i>SpeC</i>	上游-TGT CTT ATG AGG CCT CTC	386	50
	下游-ATC TGA TCT AGT CCC TTC		
<i>SpeF</i>	上游-CGA AAT TAG AAA AGA GGA C	1 193	57
	下游-GGC TGA GCA AAA GTG TGT G		
<i>SpeG</i>	上游-GAT GAA AAT TTA AAA GAT TTA A	648	50
	下游-GGG GGG AGA ATA GCA CTA GT		
<i>SpeH</i>	上游-CAC ATA TTG ATA AGA AAA TCT ACA GC	666	59
	下游-GAA ATT GAG TTG AGT CTA TTC TCT CG		
<i>SpeI</i>	上游-CTT TGG AGT ATT CTC CTC CC	382	59
	下游-CTC TCT CTG TCA CCA TGT CC		
<i>SpeJ</i>	上游-GAT AGT GAA AAT ATT AAA GAC G	630	55
	下游-TTA TTT AGT CCA AAG GTA AAT ATC		
<i>SpeK</i>	上游-GTC ATA TCA TGT TGT ATG CAA	343	50
	下游-GTT TAA GTG AAC ATC AAA GTG		
<i>SpeL</i>	上游-TTA GGA TGG TTT CTG CGG AAG AGA C	596	60
	下游-TTC CTC TTT CTC GCC TGA GCC GTG		
<i>SpeM</i>	上游-GCT CTA TAC ACT ACT GAG AGT GTC	612	56
	下游-CAT ATC AAT CGT TTC ATT ATC TG		
<i>SmeZ</i>	上游-GAA GTA GAT AAT AAT TCC CTT CTA AGG	576	55
	下游-AGT CAA TTT CTA TAT CTA AAT GCC C		
<i>Ssa</i>	上游-GTG CAC AAT TAT TAT CGA TTA GTG	723	60
	下游-GGT GAA CCT CTA TAG CTA TAG CTG AAG		

表 2 13 种超抗原的双重实时荧光 PCR 方法的配伍及各自引物与探针序列

组别	基因	引物和探针序列(5'-3')
1	<i>SpeA</i>	上游-CAA GAG GTA TTT GCT CAA CAA G
		下游-CAC ATT CTC GTG AGT AAC AGG
		探针-FAM-CCC GAT CCA AGC CAA CTT CAC AGA-BHQ1
<i>SpeL</i>	<i>SpeL</i>	上游-GTC AGC ACC TTC CTC TTT C
		下游-ATC TCC CGT TAC CTT CCA G
		探针-HEX-CGC CTG AGC CGT GAA A-BHQ1
2	<i>SpeB</i>	上游-CGG ACG TAA CTT CTA CCA TG
		下游-TTT GAT GCC TAC AAC AGC AC

续表 2 13 种超抗原的双重实时荧光 PCR 方法的配伍及各自引物与探针序列

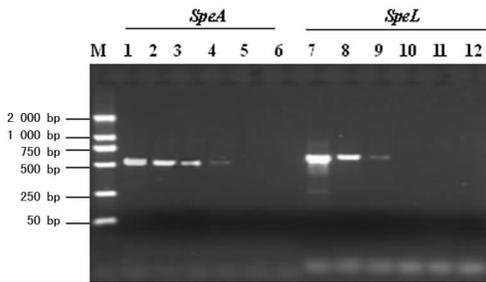
组别	基因	引物和探针序列(5'-3')	
3	<i>Ssa</i>	探针-FAM-AAC CGT TGA AGC CGC C-BHQ1	
		上游-CGG GAA CTT ACC TTC AAT TTG	
		下游-CTA TAA CTG CTA TTA TTC GGA AGG	
	<i>SpeC</i>	探针-HEX-TGC TCA GTA ACA CCT CC-BHQ1	
		上游-CGT AAC TTT CCA GGA AAT TGA C	
		下游-GCT CAT GTT TCC CAT CTT TTG	
<i>SpeH</i>	探针-FAM-CGA TTC TGC CGC TTA CA-BHQ1		
	上游-AGT TCC TGT AAA CGT GTG G		
	下游-CCT GAG CGG TTA CTT TCG		
4	<i>SpeG</i>	探针-HEX-AAC AAC AGC CGC CTA TG-BHQ1	
		上游-AAC AGT TTA CTT TAC AGG AAT TTG	
		下游-TGT TTA CTA TCT TTA GTA GCA AGG	
	<i>SpeF</i>	探针-FAM-AAA GGC TCC CCG ATG T-BHQ1	
		上游-CAT TGA TAC CAC GAC AGC TCT TG	
		下游-TAG AAG CAA ATC GTG ATG GCT ATC	
5	<i>SpeM</i>	探针-HEX-AGC CGC TCC AAT CTA CAA CGC AGA CGA-BHQ1	
		上游-TTC GCT ATT AAC CAA CAC AGC ATC	
		下游-TGT TAT TCC TTG TGT GTG TAT CGC	
	<i>SpeI</i>	探针-FAM-AAG ACA CTC TCA GTA G-NF-MGB	
		上游-ATA TGA TCC AAC AGA AGT AAA AGG	
		下游-CAAT CGA ACT ATT GCC ATA AGG	
6	<i>SpeJ</i>	探针-HEX-AAT GAA GGT CCG CCA-BHQ1	
		上游-TCT ACT GGT ATG ATT TCG TAT GCG	
		下游-TCA TGG GTA CGG AAG TGT AAA ATC	
	<i>SpeK</i>	探针-FAM-TTG TAG CTT AAC GTC-NF-MGB	
		上游-ACG TAT CTG AAA AGA CAC TCT C	
		下游-ATA CCT TGA CTT TGT TAT TCC TTG	
7	<i>SmeZ</i>	探针-HEX-AGA GCA AGC GAT ACA CA-BHQ1	
		上游-GCC AAT GAT TTT AAA GMT GGA G	
		下游-TAT ATG CTG TGA CTT TTC CTT TTG	
	内质控	内质控	探针-FAM-CTG TGT TCT CCG TCC CA-BHQ1
			上游-GGT GTA TAA CGT GTC AGA GAC C
			下游-CTT CTC CAA CAT ACT ATG CAA C
		探针-HEX-CCT GTC CAC CTT CCT C-BHQ1	

2 结 果

2.1 特异度检测结果 分别用普通定性 PCR 和双重实时荧光 PCR 对 13 种链球菌超抗原样本、肺炎支原体、流行性脑膜炎双球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌标本进行检测,结果表明,普通定性 PCR 和双重实时荧光 PCR 能特异性检测出 13 种链球菌超抗原样本,而肺炎支原体、流行性脑膜炎双球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌标本则均为阴性。

2.2 灵敏度检测结果 分别对 13 种链球菌超抗原的各自 5

个 10 倍梯度稀释样本同时进行普通定性 PCR 和双重实时荧光 PCR 检测,普通定性 PCR 电泳图见图 1(以 *SpeA* 和 *SpeL* 组合为例),双重实时荧光 PCR 扩增曲线图见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)(以 *SpeA* 和 *SpeL* 组合为例)。从结果上看,实时荧光 PCR 的检测下限要低于普通定性 PCR,普通定性 PCR 最多只能检测到 1:100 的稀释浓度,而实时荧光 PCR 则至少能检测到 1:1 000 的稀释浓度以上。在 13 种链球菌超抗原中,*SpeC*、*SpeG* 和 *SpeM* 的实时荧光 PCR 检测灵敏度高于普通定性 PCR 1 个数量级(10 倍),而其他 10 种超抗原实时荧光 PCR 检测灵敏度均高于普通定性 PCR 2 个数量级(100 倍)及以上。



M:DNA 标记物 D2000;1~5:*SpeA* 阳性样品的 5 个梯度稀释样品(模板浓度由原液、 10^{-1} ~ 1×10^{-4})扩增产物;6:阴性对照;7~11:*SpeL* 阳性样品的 5 个梯度稀释样品(模板浓度由原液、 10^{-1} ~ 1×10^{-4})扩增产物;12:阴性对照。

图 1 *SpeA* 和 *SpeL* 普通定性 PCR 扩增图

3 讨论

链球菌严重威胁人类的健康,它能分泌包括超抗原在内的一系列毒力因子,这些毒力因子在多种感染性疾病、自身免疫性疾病以及肿瘤的发病机制中起重要作用。超抗原以 MHC II 类分子依赖或非依赖的方式,与 TCR $V\beta$ 结合激活 T 细胞,比普通抗原高 1 000~100 000 倍左右^[4]。因此,研究超抗原基因在链球菌菌株中的分布,有助于链球菌致病机制的深入研究,便于更好地指导临床感染性疾病和自身免疫性疾病的治疗。

研究发现,超抗原基因在链球菌菌株中的分布存在不稳定性,各个地区的超抗原基因存在情况也有所差异。因此需要开展链球菌菌株中超抗原基因的流行性调查。近年来分子生物学的发展为超抗原基因的检测提供了很好的技术条件。如 Meisal 等^[3]建立的普通定性 PCR 检测超抗原基因技术,它能快速地对链球菌菌株中的各种超抗原基因进行检测。但是由于普通定性 PCR 的灵敏度较低,且其操作复杂,易造成污染。因此该方法已不符合当前的发展需要。近年来,在普通 PCR 基础上发展起来的实时荧光定量 PCR 将核酸检测的特异度和灵敏度大大提高。它克服了常规 PCR 易造成实验室污染的缺点,保持了灵敏度、特异度高的优点,还能进行准确定量,使常规 PCR 实现了从定性^[4-8]到定量^[9-12]的革命性飞跃。由于整个扩增和检测过程均为闭管操作,不需开盖吸取扩增产物进行电泳,避免了 PCR 扩增产物的污染,减少了假阳性结果,广泛用于临床病原体的检测^[13-15]。

本研究基于实时荧光定量 PCR 技术平台建立了链球菌超抗原基因双重实时荧光 PCR 检测方法,并将其与普通定性 PCR 法从灵敏度和特异度两个方面进行比较研究。结果发现荧光 PCR 的灵敏度要明显高于普通 PCR,其敏感性至少要高

于普通定性 PCR 1 个数量级以上。在特异度方面,用普通定性 PCR 和实时荧光 PCR 法分别对其他相似菌株 MP、流行性脑膜炎双球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、MRSA 进行检测,检测结果均为阴性,这表明实时荧光 PCR 法检测链球菌超抗原基因的特异度与普通定性 PCR 法相当。因此,本研究建立的实时荧光 PCR 法能更加准确、快速、灵敏地对链球菌菌株中的超抗原基因进行检测分析。

参考文献

- [1] Davies MR, Holden MT, Coupland P, et al. Emergence of scarlet fever *Streptococcus pyogenes* emm12 clones in Hongkong is associated with toxin acquisition and multidrug resistance [J]. Nat Genet, 2015, 47(1): 84-87.
- [2] 王海滨, 温雯, 王恒伟, 等. 2011 年北京市朝阳区儿童 A 组溶血性链球菌的 emm 基因分型及耐药性分析 [J]. 疾病监测, 2012, 27(6): 424-427.
- [3] Meisal R, Andreasson IK, Høiby EA, et al. *Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: emm types, multilocus sequence types, and superantigen profiles [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(3): 842-851.
- [4] 徐薇, 覃小敏, 鲁巧云, 等. 女性外阴尖锐湿疣患者 HPV 感染的基因分型及复发情况分析 [J]. 国际病毒学杂志, 2014, 21(6): 279-281.
- [5] 李阳桦, 陈艳伟, 何丽丽, 等. 2008-2013 北京市 6 岁以下儿童手足口病流行特征分析 [J]. 国际病毒学杂志, 2015, 22(1): 1-4.
- [6] 张国昌, 杨官征. 手足口病重症病例病毒分型与临床特点分析 [J]. 国际病毒学杂志, 2014, 21(5): 218-220.
- [7] 李洁, 陈丽娟, 林长缨, 等. 北京市 2010-2013 年急性出血性结膜炎的病原学分析 [J]. 国际病毒学杂志, 2015, 22(2): 77-82.
- [8] 王昕, 房师松, 彭博, 等. 深圳市流感样病例感染常见呼吸道病毒的流行特征分析 [J]. 国际病毒学杂志, 2015, 22(3): 165-169.
- [9] 刘军, 王丹. 急性呼吸道感染住院患儿 RSV 和 ADV 与病情严重程度相关性研究 [J]. 国际病毒学杂志, 2015, 22(1): 33-35.
- [10] 屈宏宇, 阮春来, 刘志强, 等. 2006-2013 年北京市平谷区病毒性传染病流行趋势分析 [J]. 国际病毒学杂志, 2015, 22(3): 183-185.
- [11] 田新贵, 周荣. 高通量技术在病毒学研究中的应用 [J]. 国际病毒学杂志, 2015, 22(1): 68-72.
- [12] 付万智, 杨丽, 胡晓勤. 慢性乙肝患者血清 HBV DNA 载量与 HBV-M、ALT、AST 含量的关系研究 [J]. 国际病毒学杂志, 2015, 22(2): 111-114.
- [13] 李明辉, 李海峰, 夏海波, 等. FQ-PCR 检测尿巨细胞病毒在婴儿 CMV 感染中的应用价值 [J]. 国际病毒学杂志, 2014, 21(6): 286-289.
- [14] Kim K, Kim BJ, Shim TS, et al. Development of a peptide nucleic acid-based multiprobe real-time PCR method targeting the hsp65 gene for differentiation among *Mycobacterium abscessus* strains [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(4): 1403-1405.
- [15] 宋景红, 庄国良, 王志越, 等. 实时荧光定量 RT-PCR 法定量检测手足口病原体的探讨 [J]. 国际病毒学杂志, 2014, 21(3): 110-112.

(收稿日期: 2015-10-20)

