

• 论著 •

性病病原体多重聚合酶链反应检测方法的建立和验证

姚峰 张琴 姜久昆 陆远强

【摘要】 目的 建立同时检测淋球菌、沙眼衣原体、解脲支原体和单纯疱疹病毒-2 致病微生物的多重聚合酶链反应(PCR)方法,用于四种性病的诊断和治疗监测。方法 根据淋球菌外膜孔蛋白基因、沙眼衣原体基因、解脲支原体尿素酶基因和单纯疱疹病毒-2 的 DNA 聚合酶基因序列,各设计一对特异性引物,优化反应体系和条件进行多重 PCR 反应。结果 4 对引物分别扩增出 327、167、426、391 bp 的目的条带,并且特异性强,与其他非目的病原体基因不发生反应。结论 本研究建立的多重 PCR 方法为相关病原体的快速检测提供方法。

【关键词】 奈瑟球菌,淋病;衣原体,沙眼;解脲支原体;单纯疱疹病毒属;聚合酶链反应

Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of sexually transmitted pathogens YAO Feng, ZHANG Qin, JIANG Jiu-kun, LU Yuan-qiang. Department of Emergency, First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

Corresponding author: LU Yuan-qiang, Email: luyuanqiang@yahoo.cn

【Abstract】 Objective To develop a multiplex polymerase chain reaction (PCR) method for simultaneous detection of sexually transmitted pathogens. **Methods** According to specific gene sequence of four pathogens: porin protein of neisseria gonorrhoeae, chlamydia trachomatis, urease of ureaplasma urealyticum and DNA polymerase of human herpesvirus 2, four sets of specific primers were designed and a multiplex PCR assay was developed to detect 4 pathogens in one test based on the optimized reaction system and condition. **Results** The target DNA at 327, 167, 426 and 391 bp of 4 pathogens were specifically amplified by their specific primers. The DNA of other several common pathogens including gardnerella vaginalis, trichomoniasis, acinetobacter baumannii. was not amplified by four sets of primers. **Conclusion** It was shown that a simultaneous, specific and rapid multiplex PCR assay method was successfully constructed to detect four sexually transmitted pathogens.

【Key words】 Neisseria gonorrhoeae; Chlamydia trachomatis; Ureaplasma urealyticum;

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2012.03.003

基金项目:浙江省人口和计划生育科技项目(N20100011)

作者单位:310003 杭州,浙江大学医学院附属第一医院急诊科

通讯作者:陆远强, Email: luyuanqiang@yahoo.cn

Simplexvirus; Polymerase chain reaction

性病被认为是当今世界上流行范围最广的传染病,其在我国的发病率也逐年增高,并有从高危人群向普通人群蔓延的倾向。淋球菌、沙眼衣原体、解脲支原体和单纯疱疹病毒-2 是引起性传播疾病的常见病原菌。淋病检测的“金标准”仍是细菌培养或涂片镜检,但由于淋球菌的体外抵抗力弱,对取材和送检等要求较高,加之抗生素的滥用导致淋病症状的不典型性,严重影响了上述方法的敏感性,常规聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和实时荧光定量 PCR 已成为国内外淋球菌的常规筛检手段^[1-5]。沙眼衣原体和解脲支原体不能单独在体外存活,传统检查手段细胞培养法,费时费力,对技术和仪器要求较高,目前已被新的基于分子生物学的快速免疫层析法、直接荧光或金标抗体技术、酶免疫测定和 PCR 技术等检测技术所替代^[6-8]。传统的单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)感染实验室检测主要是 HSV 分离培养和血清免疫学方法,但敏感性欠佳,且费时费力,PCR 技术和微悬臂免疫传感器逐渐应用于 HSV 的检测^[9-10]。由于性病的混合感染即同时感染两种或两种以上的性病的患者的比例较高,建立同时检测上述病原体的方法能提高临床诊断效率,具有实际运用意义。多重 PCR 技术已广泛用于多种混合疾病的诊断,但目前未有关于这四种疾病的方法。本研究建立了一种多重 PCR 技术,为快速检测多种性病病原体提供了方法。

1 资料与方法

淋球菌、沙眼衣原体、解脲支原体和单纯疱疹病毒-2 四种病原体分别由确证的相应单一性病患者体液培养后获得。引物设计与合成: 根据 GenBank 登录的淋球菌 strain B-340 porinIB 蛋白基因、沙眼衣原体 A2497 基因和解脲支原体尿素酶基因, Human herpesvirus 2 isolate 06490396 DNA polymerase (UL30) 基因, 按照多重 PCR 引物设计原则, 采用 PrimerPremier 5.0 软件设计 4 对引物(表 1), 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。多重 PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

表 1 多重 PCR 引物序列与靶基因扩增长度

病原体	引物序列	大小(bp)	基因序列号
淋球菌	GATGTCACCCTGTACGGTGCCATCAAA GGATTCCAAGCATTGACGTT	327	GU058271.1
HSV-2	ATGGTGAACATCGACATGTACGG CCTCCTGTGCGAGGCCCGAAAC	391	HQ123177.1
沙眼衣原体	GTAGCCCTACCGGAAGGTGG CAAACATATGTCTCGTCTCCTCACC	167	CP002401.1
解脲支原体	TCTGCTCGTGAAGTATTAC ACGACGTCCATAAGCAAC	426	AF085729.2

注: PCR: 聚合酶链反应(polymerase chain reaction); HSV: 单纯疱疹病毒(herpes simplex virus)

单一 PCR 反应的特异性检测: 使用试剂盒分别提取淋球菌、沙眼衣原体、解脲支原体和单纯疱疹病毒-2 病原体基因组 DNA, 以相应特异性引物进行单一 PCR 扩增, 验证引物的特异性。

多重 PCR 反应条件的优化: 分别以淋球菌、沙眼衣原体、解脲支原体和单纯疱疹病毒-2 病原体基因组 DNA 为模板, 采用四对 PCR 引物, 优化确定多重 PCR 反应条件。优化的条件包括

模板浓度、引物浓度、退火温度和反应时间。

样本检测:典型症状患者的标本采集尿道分泌物、脓液等用无菌生理盐水稀释采集,保存于 -20°C 以下待检。

2 结果

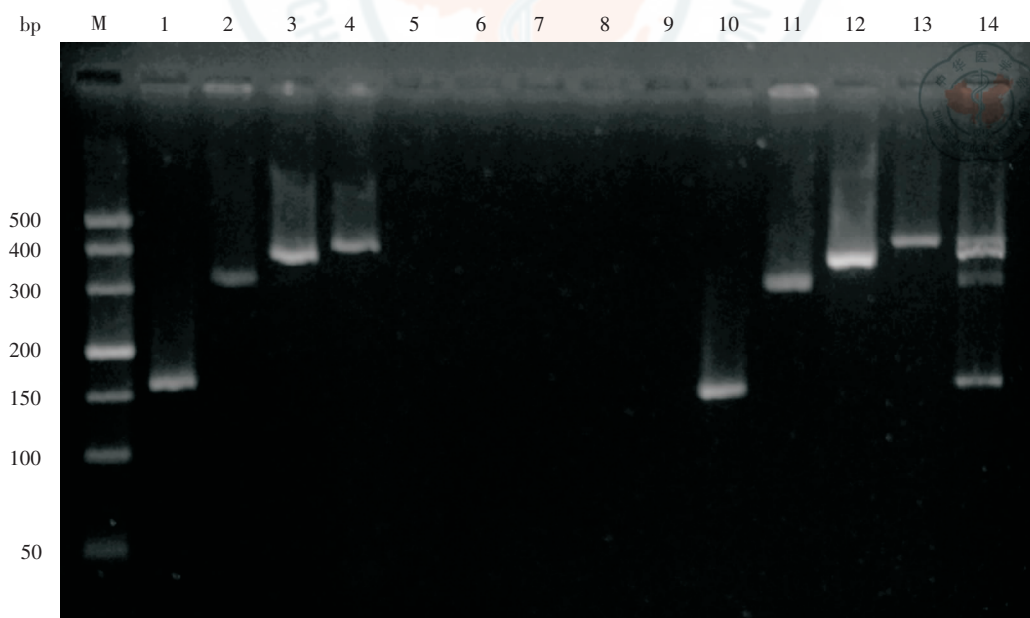
2.1 单一 PCR 方法的建立 对四种病原体基因组进行单一 PCR 扩增,结果显示仅对对应病原体的基因组发生特异反应,在相应的位置出现特异长度的条带,且测序后表明为目的条带。

2.2 多重 PCR 反应条件的优化

采用 Multiplex PCR Assay kit 优化多重 PCR 反应体系: Multiplex PCR Mix 1: $0.25\ \mu\text{l}$, Multiplex PCR Mix 2: $25\ \mu\text{l}$, 病原体 DNA 模板 $5\ \mu\text{l}$, 每种引物 ($20\ \text{pmol} / \mu\text{l}$) $0.5\ \mu\text{l}$ 。反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 90 s, 72°C 90 s, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物于琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3 多重 PCR 反应的特异性

多种病原体 DNA 为模板。采用优化的多重 PCR 反应体系进行扩增,结果显示以单一淋球菌、沙眼衣原体、解脲支原体和单纯疱疹病毒-2 基因组 DNA 为模板和以四种混合病原体基因组为模板均出现目的条带,而其他非目的病原体均未扩增出任何片段(图 1),表明该方法具有良好的特异性。



注: M: DNA marker; 1~4: 沙眼衣原体、淋球菌、单纯疱疹病毒-2 和解脲支原体单一基因组经对应单一引物的扩增片段; 5~9: 阴道加特纳菌、阴道毛滴虫、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯氏菌、大肠埃希菌基因组分别经混合四组引物扩增; 10~13: 沙眼衣原体、淋球菌、单纯疱疹病毒-2 和解脲支原体基因组分别经四组混合引物多重 PCR 扩增; 14: 混合四种目标基因组经四组混合引物的扩增

图 1 多重 PCR 反应特异性实验结果

2.4 临床检测结果

根据优化的多重 PCR 反应条件,分别检测淋球菌样本 19 个,单纯疱疹病毒-2 样本 18 个,沙眼衣原体样本 24 个,解脲支原体样本 22 个,均能得到阳性结果,同时在其中一个沙眼衣原体样本中检测到解脲支原体感染,后该样本经常规临床培养也确诊为解脲支原体感染阳性。

3 讨论

选择特异的保守基因作为靶基因,设计合适的引物是 PCR 法检测病原菌的基础。目前用于临床检测淋病奈瑟菌的特异性基因有胞嘧啶 DNA 甲基转移酶,16S 核糖体 rRNA,隐蔽性质粒基因,ORF1,Opa 和 Por,敏感性均高于细菌培养和涂片镜检,特异性大于 95%。用于沙眼衣原体 PCR 检测的靶基因有外膜主蛋白基因、隐蔽性质粒和 16S rRNA 基因等。用于解脲支原体 PCR 检测的基因包括多带抗原基因、16S rRNA 基因和尿素酶基因。HSV-1 和 HSV-2 均可感染人类,两者同源性达 40%,PCR 检测 HSV-2 能需要与 HSV-1 进行甄别。结合文献和有关专利技术发现用于以上四种病原体 PCR 诊断方法的引物设计范围相对宽松,但本实验为同时测定四种病原体,在选择检测靶基因和设计引物时除根据一般的引物设计原则外还应满足:各引物均有相似的 DNA 熔解温度值,各引物间不会形成二聚体,为了满足聚丙烯酰胺凝胶电泳 DNA 可分辨率的要求,各目的片段大小差距在 15 bp 以上。基于此,本实验利用计算机软件 Primer Premier 5.0 设计了各个病原体对应的引物,进行了分析和模拟杂交,最终所用引物见表 1,并通过模板浓度、引物浓度、退火温度和反应时间参数的优化,获得较好的敏感性结果。

本研究建立的多重 PCR 检测了 83 份临床标本,与临床常规培养检查结果进行比较,均有较好的一致性。这表明建立的多重 PCR 可用于同时特异检测四种常见性病病原体,为性病的确诊提供快速、准确的诊断方法。

参 考 文 献

- 1 Lindan C, Mathur M, Kumta S, et al. Utility of pooled urine specimens for detection of chlamydia trachomatis and neisseriagonorrhoeae in men attending public sexually transmitted infection clinics in Mumbai, India, by PCR. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (4): 1674-1671.
- 2 Lowe P, O'Loughlin P, Evans K, et al. Comparison of the Gen-Probe APTIMA Combo 2 assay to the AMPLICOR CT/NG assay for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in urine samples from Australian men and women. *J Clin Microbiol*, 2006, 44 (7): 2619-2621.
- 3 Palmer HM, Mallinson H, Wood RL, et al. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of Neisseria gonorrhoeae. *J Clin Microbiol*, 2003, 41 (2): 835-837.
- 4 Geraats-Peters CW, Brouwers M, et al. Specific and sensitive detection of Neisseria gonorrhoeae in clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (11): 5653-5659.
- 5 Hjelmvoll SO, Olsen ME, Sollid JU, et al. A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the Neisseria gonorrhoeae porA pseudogene. *J Mol Diagn*, 2006, 8 (5): 574-581.
- 6 Mabey D, Peeling RW. Rapid diagnostic tests for sexually transmitted infections. *IPPF Medical Bulletin*, 2002, 36 (3): 1-3.
- 7 Jensen JS, Borre MB, Dohn B. Detection of mycoplasma genitalium by PCR amplification of the 16S rRNA Gene. *J Clin Microbiol*, 2003, 41 (1): 261-266.
- 8 刘池波,潘春琴,牟思华.慢性阴道炎患者生殖道解脲支原体和沙眼衣原体感染分析. *中国微生态学杂志*, 2007, 19(1):82-83.
- 9 徐建云,王赅胤,严华,等.微悬臂免疫传感器用于单纯疱疹病毒的无标记测定. *分析化学*, 2009, 37

(A03):321-321.

- 10 张萍,张修发,江凡,等. 实时定量 HSVPCR 实验中一种内参的建立. 海南医学,2011,22(8):11-13.
- 11 Harbecke R, Oxman MN, Arnold BA. A real-time PCR assay to identify and discriminate among wild-type and vaccine strains of varicella-zoster virus and herpes simplex virus in clinical specimens, and comparison with the clinical diagnoses. J Med Virol, 2009, 81 (7): 1310-1322.
- 12 张秀兴. 淋球菌感染与其他性传播性疾病感染关系的研究. 中国实用医药,2008,3(17):21-22.
- 13 刘小平,樊尚荣,李建武,等. 深圳市人工流产女青少年生殖道感染状况及相关因素分析. 中国全科医学,2004,7(15):1052-1054.
- 14 汪芳金,金刚石,钱建荣,等. 608 名女性性工作者性传播疾病感染情况调查. 浙江预防医学,2008,20(5):33,41.

(收稿日期:2012-03-15)

(本文编辑:王思师)

姚峰,张琴,姜久昆,等. 性病病原体多重聚合酶链反应检测方法的建立和验证[J/CD]. 中华危重症医学杂志:电子版,2012,5(3):158-162.



中华医学会