

不对称重组酶介导扩增结合分子信标检测金黄色葡萄球菌方法的建立与应用

周琳 徐欢 杨成 张峰岭 罗杰 蒋文斌 汪超 唱凯 鲁卫平 陈鸣

【摘要】 目的 建立一种基于重组酶介导扩增技术(RAA)与分子信标相结合的病原菌恒温快速检测方法。方法 方法学的建立。通过金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)所对应的基因设计相应引物及分子信标探针,不断调整引物浓度比例以确定最佳引物浓度比来进行不对称扩增,利用不对称重组酶介导扩增并与分子信标探针杂交,通过琼脂糖凝胶电泳及荧光采集观测结果。将阳性质粒以 10 倍的梯度稀释,检测该方法的灵敏度。利用该 RAA 杂交法检测大坪医院检验科微生物室保存的 2016 年 12 月的 72 株含金黄色葡萄球菌及葡萄球菌属其他种细菌的菌株,以检测该方法的特异性。在特异性实验基础上添加我室保存的 2016 年 12 月的 39 例其他菌株进行 $Kappa$ 一致性检验及临床诊断效能评价。结果 当限制性引物与非限制性引物的浓度比例在 1:20 时,产生单链 DNA(ssDNA)的效率最高。不对称 RAA 扩增与分子信标探针杂交的效率明显高于对称扩增。该方法的灵敏度为 20 拷贝/ μl 。RAA 杂交法能够将金黄色葡萄球菌与葡萄球菌属其他菌株区分,与传统金标准相比 $Kappa$ 为 0.860,一致性良好。经过对 111 株菌株的检测,该方法敏感度为 92.5% (37/40),特异度为 97.2% (69/71),阳性预测值为 94.9% (37/39),阴性预测值为 95.8% (69/72),阳性似然比为 33.04,阴性似然比为 0.077,约登指数为 0.897。与传统金标准相比, $Kappa$ 为 0.902,两种方法一致性良好。结论 通过对不对称 RAA 扩增条件的优化及与分子信标探针的结合,建立了 RAA 杂交技术检测细菌 DNA 的新方法,为恒温扩增应用于临床奠定基础。(中华检验医学杂志,2017,40:309-313)

【关键词】 金黄色葡萄球菌; 核酸扩增技术; 分子探针

基金项目:全军后勤计划重大专项课题子课题(AWS14C003-2);国家自然科学基金重点项目(81430053);国家自然科学基金(81401751,81171667)

Establishment and application of the molecular-beacon-based asymmetric recombinase amplification for detecting *Staphylococcus aureus* Zhou Lin, Xu Huan, Yang Cheng, Zhang Fengling, Luo Jie, Jiang Wenbin, Wang Chao, Chang Kai, Lu Weiping, Chen Ming. Department of Clinical Laboratory, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China
Corresponding author: Chen Ming, Email: chming1971@126.com

【Abstract】 Objective To establish a homothermal and fast detecting method on pathogenic bacteria by combining recombinase-aid amplification (RAA) with molecular beacon. **Methods** The establishment of the methodology. *Staphylococcus aureus* specific primers were designed from the relative region of the staphylococcal protein A (SPA). Asymmetry amplification was optimized by adjusting the primer concentration ratios. The results of amplification and hybridization were visualized and analyzed by agarose gel electrophoresis and fluorescence detection. The sensitivity was identified by detecting dilute positive plasmids. And the specificity was determined using RAA method by detecting 72 pathogenic bacteria, including *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus spp.* from the Department of Clinical Laboratory of Daping Hospital in December 2016. Besides, the $Kappa$ analysis and the clinical diagnosis efficiency were investigated by analyzing 39 extra strains in the laboratory in December 2016. **Results** When the concentration ratio of restrictive and non-restrictive primer was 1:20, the yield efficiency of single-stranded DNA (ssDNA) reached the peak. And as for the hybridization efficiency, the asymmetry amplification was higher than symmetry amplification. Twenty copies/ μl was proposed as the limits of detection by testing dilute plasmids. And the RAA hybridization method could distinguish *Staphylococcus aureus* with other

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2017.04.019

作者单位:400042 重庆,第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所检验科

通信作者:陈鸣,电子信箱:chming1971@126.com

Staphylococcus spp. Comparing with traditional detection methods with a Kappa index of 0.860, this method shows a good consistency. By analyzing the 111 bacteria, the sensitivity of the method is 92.5% (37/40), the specificity is 97.2% (69/71), the positive predictive value is 94.9% (37/39), the negative predictive value is 95.8% (69/72), the positive likelihood ratio is 33.04, the negative likelihood ratio is 0.077, the Youden index is 0.897 and the Kappa index is 0.902. **Conclusion** Through the combination of asymmetry recombinase-aid amplification optimization and molecular beacon probe, a new method of detecting bacteria DNA with RAA hybridization technique is established, providing the foundation for its clinical application. (*Chin J Lab Med*, 2017, 40: 309-313)

[Key words] *Staphylococcus aureus*; Nucleic acid amplification techniques; Molecular probes

Fund program: Special Project of the "Twelfth Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (AWS14C003-2); Key Program of the National Natural Science Foundation of China (81430053); National Natural Science Foundation of China (81401751, 81171667)

金黄色葡萄球菌是引起人类化脓感染的常见病原菌,而传统的培养法费时较长,容易延误病情的治疗^[1],因此,PCR等分子生物学方法开始用于检测病原菌^[2]。PCR技术虽然克服了传统方法的一些缺点,但由于其是一个热循环过程,难以做到便携式、小型化,更难以在实验室外的环境下使用^[3],因此,恒温核酸体外扩增技术开始受到广泛的关注。目前常见的恒温扩增技术包括链置换扩增技术^[4]、滚环扩增技术^[5]以及环介导等温扩增技术^[6-7]等。重组酶介导扩增(recombinase-aid Amplification, RAA)技术利用重组酶、单链DNA结合蛋白和DNA聚合酶,实现核酸的恒温扩增。相较于之前的扩增技术,其优势在于仅需要一对普通引物在常温下即可完成对模板的扩增,整个过程更接近于生物状态下的扩增过程^[8-9]。然而,目前RAA还无法实现与常用探针直接结合应用^[10]。分子信标是基于荧光共振能量转移现象设计的核酸探针,当其与其靶序列结合时,分子信标的茎环结构被打开,即可以检测到荧光基团发出的荧光^[11]。本研究尝试将RAA技术与分子信标相结合,并选择金黄色葡萄球菌作为检测的靶细菌来验证其可行性。

材料与amp;方法

一、材料

1. 菌株来源:葡萄球菌属包括金黄色葡萄球菌40株,表皮葡萄球菌11株,人葡萄球菌10株,溶血葡萄球菌9株,孔氏葡萄球菌和模仿葡萄球菌各1株均为重庆市大坪医院检验科微生物室2016年12月保存的菌株。其他阴性对照菌株包括肺炎克雷伯菌9株,大肠埃希菌6株,鲍曼不动杆菌5株,阴沟肠杆菌4株,铜绿假单胞菌4株,洋葱伯克霍尔德菌2株,黏质沙雷菌2株,屎肠球菌、唾液链球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、奇异变形杆菌、木糖氧化产碱杆菌各1株同样为重庆

市大坪医院检验科微生物室2016年12月保存的菌株。

2. 主要仪器与试剂:CFX96荧光定量PCR扩增仪(美国Bio-Rad公司),RAA基础试剂盒(江苏奇天基因公司),细菌DNA提取试剂盒(北京天根公司),引物、分子信标及模板的合成(北京擎科公司),BG-subMIDI(v)可见光电泳—透射仪(北京百晶公司),Bio-Rad ChemiDoc XRS凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

3. 特异性引物及分子信标设计:通过美国国家生物技术信息中心数据库中查得金黄色葡萄球菌spa蛋白对应的基因序列,利用primer premier5软件设计特异性引物,上游引物:5'-TTCGTAACCTA GGTGTAGGTATTGCATCTG-3',下游引物:5'-CTTT GGCTTGGATCATCTTTAAGGCTTTGG-3',扩增产物长度为199 bp。然后,用Beacon Designer软件设计特异性分子信标,探针:5'-CGCGATATCAG CGTTAAGTTAGGCAATCGCG-3',分子信标5'端标记FAM荧光基因,3'端标记BHQ-1淬灭基团,构建含有靶序列的puc质粒作为阳性标准品,引物、探针及质粒均由北京擎科公司合成。

二、方法

1. 细菌菌株DNA的提取:将各种细菌菌株接种于血平板过夜培养,取无菌0.5 ml离心管,加入无菌蒸馏水50 μl,挑取菌落在其中混匀,100℃加热10 min,之后12 000 ×g离心10 min,上清移入另一离心管中作为扩增模板。

2. 最适引物浓度比确定:为了产生单链目的基因片段,以便于下一步的杂交及后续试验。采用不对称RAA扩增方法,将正向引物作为非限制性引物,反向引物作为限制性引物,非限制性引物浓度暂定为10 μmol/L,优化限制性引物和非限制性引物的浓度比分为:1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35和1:40。即将限制性引物用ddH₂O稀释,使其

浓度分别为 2、1、0.667、0.5、0.4、0.333、0.286 和 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 。RAA 反应体系共 50 μl ，含缓冲液 25 μl ，上下游引物各 2 μl ，加入 1 μl 阳性质粒作为模板，体系中模板浓度为 2×10^7 拷贝/ μl ，醋酸镁 2.5 μl ，加双蒸水至终体系 50 μl 。将其放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 90 min。

3. 分子信标探针杂交体系的建立：反应总体系共 50 μl ，含缓冲液 25 μl ，上下游引物各 2 μl ，加入 1 μl 阳性质粒作为模板，体系中模板浓度为 2×10^7 拷贝/ μl ，分子信标探针 1 μl ，醋酸镁 2.5 μl ，加双蒸水至终体系 50 μl ，引物浓度比例由最适引物浓度比实验确定，混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，选择 FAM 通道每 2 min 采集 1 次荧光信号，共采集 50 次。

4. 灵敏度实验：将阳性质粒依次进行 10 倍梯度稀释，形成浓度分别为 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 、20 和 2 拷贝/ μl ，依据上述杂交反应体系进行 RAA 杂交法实验，以其能稳定检出的最小浓度为该方法的最低检出限。

5. 特异性实验：选取本室保存葡萄球菌属菌株 72 株，过夜培养后提取其 DNA，依据上述反应体系进行 RAA 杂交法实验，所得结果与细菌培养结果相对比。

6. 临床诊断效能评价实验：选取本室保存其他阴性对照菌株 39 株，过夜培养后提取其 DNA，依据上述反应体系进行 RAA 杂交法实验。

7. 统计学分析：将上述实验结果整合，用 SPSS 13.0 软件对特异性试验及临床诊断效能实验数据进行配对四格表 McNemar 检验、Kappa 一致性检验，当 Kappa 值大于 0.7 时吻合度较强， $P < 0.05$ 表明 Kappa 值可靠。

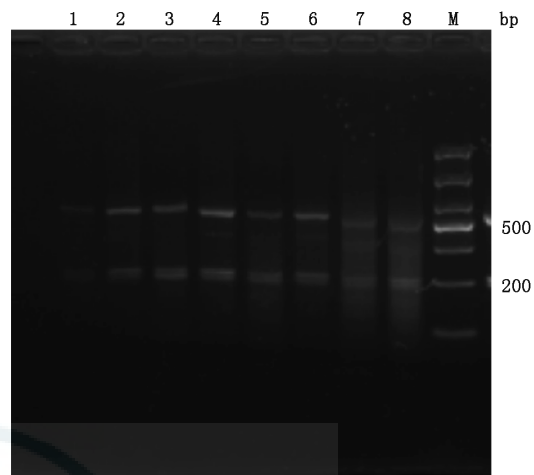
结 果

一、最佳引物浓度比例

当限制性引物与非限制性引物的浓度比例为 1:20 时，双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 条带之上的单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 条带最亮，说明在该浓度比例时产生的 ssDNA 最多，而当限制性引物与非限制性引物的比例超过 1:30 时，产生的杂条带逐渐增多，见图 1，200 bp 为扩增产物 dsDNA。

二、分子信标杂交体系的建立

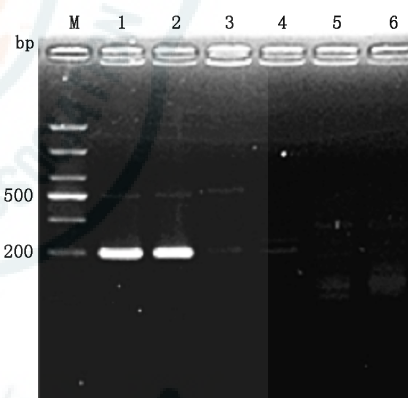
当细菌 DNA 经 RAA 对称扩增时，添加探针后条带没有发生明显变化，见图 2。而在不对称扩增后，泳道 4 相较于泳道 3 增加了杂交后的条带，并且经不对称扩增出的目的 ssDNA 条带明显减弱。



注：M 为 DNA 标准带，1~8 分别为引物比例 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 和 1:40

图 1 不同引物比例 RAA 不对称扩增结果

由此可见，尽管不对称扩增的效率要低于对称扩增，但当需要与探针结合时，不对称扩增所产生的单链可以极大地增加结合效率。



注：M 为 DNA 标准带，1 为对称 RAA 扩增未加探针，2 为对称 RAA 扩增加探针，3 为不对称 RAA 扩增未加探针，4 为不对称 RAA 扩增加探针，5 为阴性对照不对称 RAA 扩增未加探针，6 为阴性对照不对称 RAA 扩增加探针

图 2 不对称 RAA 分子信标杂交特异性实验结果

三、RAA 杂交法的灵敏度

通过将阳性质粒不断稀释之后进行 RAA 杂交，根据荧光检测的结果，当检测浓度在 20 拷贝/ μl ，尚可以分辨的荧光信号，而低于该浓度则信号微弱，难以分辨，因此，该方法的灵敏度为 20 拷贝/ μl ，见图 3。

四、RAA 杂交法的特异性

通过将本室保存的 72 株菌株进行 RAA 杂交法

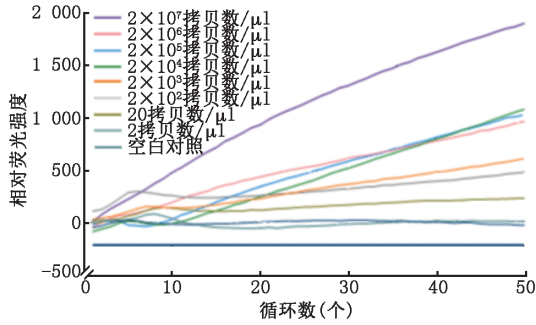


图 3 RAA 杂交法的灵敏度实验结果

检测,由表 1 可见,该方法能够在葡萄球菌属中将金黄色葡萄球菌和其他葡萄球菌很好地区分开。经配对四格表 McNemar 检验,不对称 RAA 杂交法与细菌培养法一致性较好 ($Kappa = 0.860, P < 0.05$)。

表 1 不对称 RAA 杂交法与细菌培养法检测葡萄球菌属的比较结果

RAA 杂交法	细菌培养法		合计
	金黄色葡萄球菌	其他	
金黄色葡萄球菌	37	2	39
其他	3	30	33
合计	40	32	72

注:其他指表皮葡萄球菌、人葡萄球菌、溶血葡萄球菌等

五、临床诊断效能评价

与金标准相比 RAA 杂交法的敏感度为 92.5% (37/40),特异度为 97.2% (69/71),阳性预测值为 94.9% (37/39),阴性预测值为 95.8% (69/72) 阳性似然比为 33.04,阴性似然比为 0.077,约登指数为 0.897。综合分析,RAA 杂交法检测的特异性较高,敏感度相对较低,具有发现真正的患者与非患者的能力。对表 2 数据经配对四格表 McNemar 检验、Kappa 一致性检验,不对称 RAA 杂交法与细菌培养法一致性较好 ($Kappa = 0.902, P < 0.05$),表明两种

表 2 不对称 RAA 杂交法与细菌培养法检测的比较结果

RAA 杂交法	细菌培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	37	2	39
阴性	3	69	72
合计	40	71	111

方法的结果差异无统计学意义。

讨 论

病原菌的早期快速检测一直是困扰临床的重要

问题之一,目前临床所应用的传统诊断方法虽然可以作为确诊的手段,但所需时间较长,难以实现早期诊断。因此,分子生物学方法开始受到广泛的关注,而相对于其他分子生物学方法,RAA 法在原理上最接近生理状态的核酸扩增,对模板的要求较低,也无需设计特殊的引物,在与分子信标结合后,更是无需设计特殊探针。而相较于传统的 PCR 技术,RAA 技术克服了高温变性、退火和延伸的复杂热变性过程及其假阳性率较高的缺点。本研究成功将 RAA 法与分子信标相结合,既实现了对病原菌 DNA 的等温检测,也开拓了 RAA 法的应用范围。

本研究利用临床常见金黄色葡萄球菌 SPA 蛋白相应基因设计引物,通过梯度稀释方法进行的灵敏度检测,发现其检测限可以达到 20 拷贝/ μl ,由于不对称扩增的引入,杂交效率得到了提高。众所周知,核酸分子的杂交是建立在单链基础之上的,故 DNA 双链中仅有 1 条链可以与寡核苷酸探针进行杂交反应。然而,由于 DNA 双链间的复性作用力要远远强于核酸与寡核苷酸探针间的杂交作用,因此另一条链常作为干扰链存在于杂交过程当中,影响杂交效率。不对称扩增产生单链进行杂交被认为是排除双链干扰、得到理想杂交结果的较好方式之一。但另一方面不对称扩增也影响了反应体系扩增能力,影响了整个反应的检测限,本实验中引入不对称扩增,主要是为了使整个反应都维持在常温的条件下进行,无需引入额外的温度控制系统,从而提高该反应体系在非实验室条件下的可行性。

通过对 72 株包括金葡菌、表皮葡萄球菌、人葡萄球菌、溶血葡萄球菌等菌株的检测,并将结果与传统的金标准细菌培养法比较,两种方法的 Kappa 值为 0.860,一致性良好,由此可见该方法可以很好地将金黄色葡萄球菌和其他葡萄球菌很好地区分开。本研究中的 RAA 结合分子信标法检测细菌核酸,敏感度为 92.5%,特异度为 97.2%,约登指数为 0.897,由于经过了扩增及探针结合的双重筛选,故特异性较好,但是在一定程度上也降低了反应的灵敏度。由于 RAA 技术对模板要求较低,因此本研究采用水煮法提取金葡菌 DNA,从 DNA 提取到最终结果的读取仅需花费 2 h。

本研究利用不对称 RAA 技术结合分子信标检测病原菌,为非实验室条件下病原菌感染的早期快速诊断提供了一种新的可能性。同时,不对称恒温扩增技术的发展,使得微流控芯片技术、生物传感器技术在病原菌检测领域的应用更为具象化,既简化

了微流控芯片的设计及配套设施,也可以促进其与生物传感器的直接结合,简化操作步骤,减少人为操作引起的误差,从而提高检测的精度。

目前,RAA 技术还处于初期阶段,与各种检测方法的结合还有很多不完善的地方。本研究旨在建立一种特异性、敏感性高,简便经济的快速检测病原菌方法,开拓该技术在核酸扩增之外的应用方式,促进恒温扩增技术在病原菌检测中的应用。

参 考 文 献

- [1] Yue H, Zhou Y, Wang P, et al. A facile label-free electrochemiluminescent biosensor for specific detection of *Staphylococcus aureus* utilizing the binding between immunoglobulin G and protein A [J]. *Talanta*, 2016, 153:401-406. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.03.043.
- [2] Chan WS, Tang BS, Boost MV, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a gold nanoparticle-based colourimetric polymerase chain reaction assay [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 53:105-111. DOI: 10.1016/j.bios.2013.09.027.
- [3] Zhang Y, Ozdemir P. Microfluidic DNA amplification--a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 638(2):115-125. DOI: 10.1016/j.aca.2009.02.038.
- [4] Du YC, Zhu LN, Kong DM. Label-free thioflavin T/G-quadruplex-based real-time strand displacement amplification for biosensing applications [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86:811-817. DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.083.
- [5] Mohsen MG, Kool ET. The discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription [J]. *Acc Chem Res*, 2016, 49 (11): 2540-2550. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00417.
- [6] Martineau RL, Murray SA, Ci S, et al. Improved Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays via Swarm Priming [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(1):625-632. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02578.
- [7] 鲁勇,汪一萍,应建飞,等. 环介导等温扩增快速检测临床常见曲霉菌方法的建立和应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(2):140-143. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2014.02.016.
- [8] Giuffrida MC, Spoto G. Integration of isothermal amplification methods in microfluidic devices: Recent advances [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 90:174-186. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.045.
- [9] Kersting S, Rausch V, Bier FF, et al. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens [J]. *Mikrochim Acta*, 2014, 181 (13-14): 1715-1723. DOI: 10.1007/s00604-014-1198-5.
- [10] Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64:196-211. DOI: 10.1016/j.bios.2014.08.069.
- [11] Sonkar SC, Sachdev D, Mishra PK, et al. A molecular-beacon-based asymmetric PCR assay for easy visualization of amplicons in the diagnosis of trichomoniasis [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86:41-47. DOI: 10.1016/j.bios.2016.06.025.

(收稿日期:2017-01-20)

(本文编辑:武昱)

· 时 讯 ·

第四次全国中西医结合检验医学学术会议报名

由中国中西医结合学会主办,湖南省中西医结合学会协办,湖南中医药大学第一附属医院、中南大学湘雅三医院、湖南省第二人民医院(湖南中医药大学附属人民医院)联合承办的“第四次全国中西医结合检验医学学术会议”定于2017年5月18日至21日在湖南省长沙市召开。

本次会议将围绕“结合、创新、精准、规范”的主题,邀请著名的检验、临床、科研方面的专家、学者作专题报告。并举办以结合、创新为主题的“中国中西医结合学会检验医学专

业委员会青年医(技)师演讲比赛”。同时会议将进行征文的优秀论文评选和展示。

本次会议采取网上注册,注册截止日期为2017年5月15日,报到日期:5月18日。网址(官网):www.caimlm.com。联系人:李琦,电话:13683347768;电子信箱:yourslq@126.com。

中国中西医结合学会检验医学专业委员会