

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.12.009

文章编号: 1005-8982(2016)12-0041-03

论著

生殖支原体 16SrRNA 基因和 MgPa 基因 TaqMan 荧光聚合酶链反应检测的比较研究*

唐正宇¹, 王碧玉¹, 蔡亮², 谢良伊³, 姚玲¹, 王太林¹

(1.长沙卫生职业学院,湖南长沙 410100;2.湖南省疾病预防控制中心;
3.湖南省人民医院,湖南长沙 410005)

摘要:目的 对生殖支原体(Mg)16SrRNA 基因和 MgPa 基因 TaqMan 荧光聚合酶链反应(PCR)检测结果进行比较,选取敏感度更高的靶基因进行 TaqMan 荧光 PCR 检测。**方法** 选取 Mg 16SrRNA 基因和 MgPa 基因为靶基因,根据已报道文献设计合成特异性扩增引物和探针,对泌尿生殖道拭子标本进行 TaqMan 荧光 PCR 检测,对 Mg 不同靶基因 TaqMan 荧光 PCR 检测结果进行统计学分析。**结果** Mg 16SrRNA 基因 TaqMan 荧光 PCR 检测敏感性为 90%,MgPa 基因 TaqMan 荧光 PCR 检测敏感性为 97.5%。**结论** MgPa 基因 TaqMan 荧光 PCR 敏感性要高于 16SrRNA 基因 TaqMan 荧光 PCR。

关键词: 生殖支原体;16SrRNA 基因;MgPa 基因;TaqMan 荧光聚合酶链反应

中图分类号: R446.5;R375;

文献标识码: A

Comparative study of TaqMan fluorescence PCR assay detection of mycoplasma genitalium by 16SrRNA gene and MgPa gene*

Zheng-yu Tang¹, Bi-yu Wang¹, Liang Cai², Liang-yi Xie³, Ling Yao¹, Tai-lin Wang¹

(1. Changsha Health Vocational College, Changsha, Hunan 410100, China; 2. Hunan provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China; 3. Hunan People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To compare the TaqMan fluorescence PCR detection results between mycoplasma genitalium 16SrRNA gene and MgPa gene. **Methods** Mycoplasma genitalium 16SrRNA gene and MgPa gene were selected as target genes. According to the reported literatures, the specific amplified primers and probes were designed and synthesized. Urinary tract swab specimens were detected by TaqMan fluorescent PCR. The results of TaqMan fluorescence PCR detection of different target genes of Mycoplasma genitalium were statistically analyzed. **Results** The detection sensitivity of 16SrRNA gene and MgPa gene of mycoplasma genitalium TaqMan PCR was 90% and 97.5%, respectively. **Conclusions** The sensitivity of TaqMan PCR in the genital mycoplasma MgPa gene is higher than that of the 16SrRNA gene.

Keywords: mycoplasma genitalium; 16SrRNA gene; MgPa gene; TaqMan fluorescence PCR

生殖支原体(mycoplasma genitalium, Mg)是支原体的一种,由 TULLY 等于 1981 年从男性非淋菌性尿道炎(nongonococcal urethritis, NGU)患者尿道分泌物中分离出来,是迄今为止发现的能够自我复制的最

小原核细胞型微生物^[1]。在男性 NGU 中的感染率可达 21%~45%^[2-4],2009 年欧洲 NGU 治疗指南已明确 Mg 是 NGU 病原体之一^[2]。目前 Mg 难以培养,临床标本分离率低,血清学试验与其他支原体存在较强

收稿日期:2016-02-17

* 基金项目:湖南省教育厅科研基金项目(No:14C0090)

的交叉反应,在实际检测中存在很大局限性。常规聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)对临床标本中 Mg 的检测缺乏定量评估,针对 *MgPa* 和 *16SrRNA* 两个靶基因实时荧光定量 PCR 技术在 Mg 检测方面得到一定的应用,但国内外没有对这两种基因 TaqMan 荧光 PCR 检测结果对比的文献报道,难以选择优势基因用于 TaqMan 荧光 PCR 检测,本研究对同一批临床标本根据已报道的文献针对 *16SrRNA* 基因和 *MgPa* 基因设计引物和探针进行 Mg 的核酸检测,对两种检测结果进行比较研究,选取敏感度更高的靶基因作为 TaqMan 荧光 PCR 检测方法,用于临床上 Mg 感染者基因快速、准确的诊断。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 Mg 标准菌株来源 Mg G-37 标准株由南华大学病原生物学研究所惠赠。

1.1.2 标本来源 中南大学湘雅医院皮肤性病科门诊患者、湖南省人民医院检验科泌尿生殖道拭子标本 246 例。患者同时行淋球菌、解脲脲原体、衣原体性病常规检查均为阴性。经常规 Mg *16SrRNA* 基因 PCR 检测为阳性 40 例,并经核酸测序证实;阴性标本 206 例。

1.1.3 主要试剂及仪器 Qiamp DNA mini kit(德国 QIAGEN 公司),Hot Star DNA taq 酶、dNTP mixture、Platinum Taq DNA polymerase(美国 Invitrogen 公司),PCR nucleotide mix、Nuclease-free water(美国 Promega 公司),PCR 产物纯化试剂盒(美国 Omega 公司)。实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司 7300 型)。

1.2 方法

1.2.1 引物探针设计 根据 JESEN^[9]等文献设计引物、探针。引物和探针委托 Invitrogen 生物工程公司合成。见表 1、2。

1.2.2 Mg DNA 的提取 拭子标本及标准菌液的 DNA 提取使用德国 QIAGEN 公司的 Qiamp DNA

表 1 TaqMan 荧光 PCR 中针对 *MgPa* 基因的引物及探针

引物或探针	序列(5'-3')	核苷酸位置
引物 <i>MgPa</i> -335F	GAGAAATACCTTGATGGTCAGCAA	1 420 ~ 1 443
引物 <i>MgPa</i> -432R	AATATCATATAAAGCTCTACCGTTGTTATC	1 497 ~ 1 465
探针 <i>MgPa</i> -380	FAM-ACTTTGCAATCAGAAGGT-MGB	1 445 ~ 1 462

MgPa 基因序列(GenBank 登录号 No:M31431)

表 2 TaqMan 荧光 PCR 中针对 *16SrRNA* 基因的引物及探针

引物或探针	序列(5'-3')	核苷酸位置
引物 My-ins	GTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATC	520-545
引物 MGSO-2	CACCACCTGTCACTCGGTTAACCTC	1 012-1 036
探针 Mgen-P1	FAM-CTGTCGGAGCGATCCCTTCGGTA-TAMRA	819-841

16SrRNA 基因序列(GenBank 登录号 No:X77334)

mini kit 试剂盒,具体操作参照试剂盒说明书进行,置入 -20°C 冰箱冷冻保存备用。

1.2.3 *MgPa* 基因 TaqMan 荧光 PCR 总反应体系 $25\mu\text{l}$, 在反应管内依次加入: $1\times$ PCR 反应液, 3.5mmol/L 氯化镁 MgCl_2 , 200mmol/L dNTP, 0.625U DNA taq 酶, 1.0mmol/L 正向引物 *MgPa*-335 F, 1.0mmol/L 反向引物 *MgPa*-432R, 0.1mmol/L 探针 *MgPa*-380, $5\mu\text{l}$ DNA 模板, ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 反应条件: 50°C 、 1min , 95°C 、 10min , 1 个循环, 95°C 变性 15s , 60°C 退火 1min , 共 50 个循环。每个反应板设立标准菌株阳性对照和阴性对照组。

1.2.4 Mg *16SrRNA* 基因 TaqMan 荧光 PCR 总反应体系 $50\mu\text{l}$, 在反应管内依次加入: $1\times$ PCR 反应液, 5mmol/L 氯化镁 MgCl_2 , 200mmol/L dNTP, 1.25U DNA taq 酶, 2.0mmol/L 正向引物 My-ins, 2.0mmol/L 反向引物 MGSO-2, 0.1mmol/L 探针 Mgen-P1, $4\mu\text{l}$ DNA 模板。ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 反应条件: 50°C 、 2min , 95°C 、 10min , 1 个循环, 95°C 变性 15s , 66°C 退火 1min , 共 60 个循环。每个反应包括阳性对照和阴性对照组。

2 结果

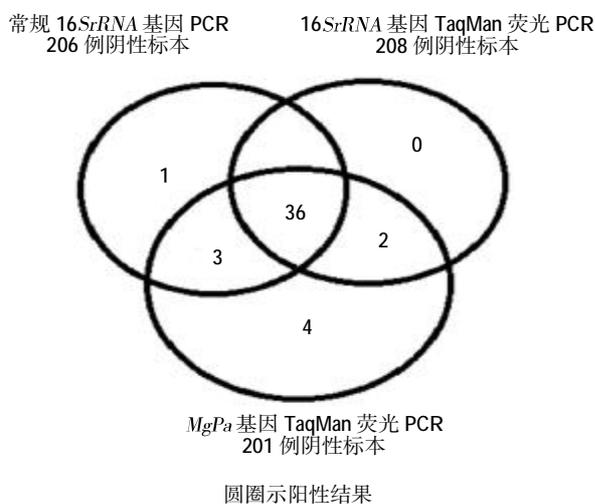
2.1 *MgPa* 基因 TaqMan 荧光 PCR 检测结果

对 246 例泌尿生殖道拭子标本进行检测, *MgPa* 基因 TaqMan 荧光 PCR 扩增阳性为 45 例, 与常规 *16SrRNA* 基因 PCR 检测结果比较阳性符合率为 97.5% ($39/40$), 阴性符合率为 97.1% ($200/206$), 总符合率为 97.2% ($239/246$)。

2.2 Mg *16SrRNA* 基因 TaqMan 荧光 PCR 检测结果

对同一批 246 例临床标本检测, Mg *16SrRNA* 基因 TaqMan 荧光 PCR 扩增阳性为 38 例, 与常规 *16SrRNA* 基因 PCR 检测结果比较阳性符合率为 90.0% ($36/40$), 阴性符合率为 99.0% ($204/206$), 总符合率为 97.6% ($240/246$)。

从检测结果中笔者发现,3 种 PCR 中都为阳性的有 36 例标本。有 3 例标本为常规 16SrRNA 基因 PCR 和 MgPa 基因 TaqMan 荧光 PCR 检测都为阳性的。仅 MgPa 基因 TaqMan 荧光 PCR 检测和 Mg 16SrRNA 基因 TaqMan 荧光 PCR 检测为阳性的有 2 例。但有 4 份标本仅是 MgPa 基因 TaqMan 荧光 PCR 检测为阳性的,经再次检测后仍为阳性。通过检测结果比较,MgPa 基因 TaqMan 荧光 PCR 敏感性(97.5%)要高于 16SrRNA 基因 TaqMan 荧光 PCR(90%)。见附图。



附图 Mg 16SrRNA 基因和 MgPa 基因 TaqMan 荧光 PCR 检测结果比较

3 讨论

YOSHIDA 等^[6]于 2002 年发表第一个实时 PCR 检测 Mg 的报道。EDBERG^[7]和 JURSTRAND^[8]等报告显示,与传统的 16SrRNA 基因 PCR 比较,实时的 16SrRNA 基因的 PCR 的敏感性较低。JURSTRAND 等^[8]文献里指出男性泌尿生殖道标本 Mg 实时 PCR 检测与常规 PCR 比较,敏感性为 72.2%,特异性为 99.7%。

在本研究中对 Mg 16SrRNA 基因和 MgPa 基因 TaqMan 荧光 PCR 检测结果进行比较。根据最新文献检测报道,采集泌尿生殖道拭子标本要优于首段尿标本,其敏感度更显著,故本研究中采集的标本为泌尿道拭子。对 246 例临床标本进行 MgPa 基因和

16SrRNA 基因的 Taqman 荧光 PCR 检测结果的比较发现,MgPa 基因 TaqMan 荧光 PCR 敏感性要高于 16SrRNA 基因 TaqMan 荧光 PCR,MgPa 基因 TaqMan 荧光 PCR 证实是最敏感的方法。在笔者的比较研究中,实时 16SrRNA 基因 PCR 在试验中需要 4 μl DNA 模板,而实时 MgPa 基因的 PCR 在试验中需要 5 μl DNA 模板,这可能与 16SrRNA 作为实时 PCR 检测的靶基因敏感性较低有关。MgPa 基因作为实时 PCR 的靶基因更适合临床 Mg 的诊断,能为今后开展人群中 Mg 的感染调查、定量分析 Mg 感染量与临床表现的关系及开展耐药监测提供依据。

参 考 文 献:

- [1] DORMAN C J. Regulation of transcription by DNA supercoiling in *Mycoplasma genitalium*; global control in the smallest known self-replicating genome[J]. *Mol Microbiol*, 2011, 81(2): 302-304.
- [2] SHAHMANESH M, MOI H, LASSAU F, et al. 2009 European guideline on the of male non-gonococcal urethritis[J]. *Int J STD AIDS*, 2009, 20(7): 458-464.
- [3] MOI H, REINTON N, MOGHADDARA A. *Mycoplasma genitalium* is associated with symptomatic and asymptomatic non-gonococcal urethritis in men[J]. *Sex Transm Infect*, 2009, 85(1): 15-18.
- [4] COX C, MCKENNA J P, WATT A P, et al. *Ureaplasma parvum* and *mycoplasma genitalium* are found to be significantly associated with microscopy-confirmed urethritis in a routine genitourinary medicine setting[J]. *Int J STD AIDS*, 2015, 16: DOI: 10.1177/0956462415597620.
- [5] JENSEN J S, BJÖRNELIUS E, DOHN B, et al. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 683-692.
- [6] YOSHIDA T, DEGUCHI T, ITO M, et al. Quantitative detection of *mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(4): 1451-1455.
- [7] EDBERG A, JURSTRAND M, JOHANSSON E, et al. comparative study of three different PCR assays for detection of *mycoplasma genitalium* in urogenital specimens from men and women[J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(3): 304-309.
- [8] JURSTRAND M, JENSEN J S, FREDLUND H, et al. Detection of *mycoplasma genitalium* in urogenital specimens by real-time PCR and by conventional PCR assay[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 54: 23-29.

(张蕾 编辑)