

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.011

支原体检测多重定量 PCR 方法的建立及应用*

霍欣洋 赵阿贵 孙国祝 周宇荀 李 凯 肖君华[△]

(东华大学化学化工与生物工程学院 上海 201620)

摘要 目的:建立一种快速、准确的方法检测支原体,这不仅可以有效地减少和预防支原体污染,还能为科研工作者提供一定的指导价值。**方法:**利用荧光定量 PCR (TaqMan 探针法)检测支原体,反应体系中同时存在标记两种颜色 TaqMan 探针及相关引物,分别检测支原体 DNA 和参考基因模板。根据支原体 16S 核糖体 RNA 保守区和参考基因 TOP3A 保守区设计引物和探针。通过对引物浓度、探针浓度和退火温度等反应条件的优化,建立了 TaqMan 探针多重定量 PCR 方法,并对该方法的特异性、敏感性和重复性进行了验证。**结果:**建立的双色荧光探针定量 PCR 方法的标准曲线相关系数 r^2 和扩增效率分别为 0.995 和 113.36%;该方法最低检测限为 10 copies/ μ L;组内及组间变异系数均小于 1%,证明该检测方法高效。利用该方法对随机挑选 90 例细胞抽提 DNA 样本进行检测,结果有 60 例为支原体阳性样本,阳性率 67%,阳性率与相关报道一致。检测 3 个细胞培养上清样本,结果 1 例支原体阳性,2 例支原体阴性。从检测的样本中随机选择 3 个阳性样本及 2 个阴性样本使用普通 PCR 支原体检测试剂盒检测,结果一致;将其测序,测序结果比对正确。**结论:**本研究建立的多重定量 PCR 支原体检测方法能够应用于细胞抽提 DNA 及细胞培养上清的支原体检测,可以实现高效、快速检测支原体污染。

关键词:支原体检测;TaqMan;多重定量 PCR;敏感性

中图分类号:Q-33;R375;R446.6 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)07-1259-04

Establishment and Application of Multiplex Quantitative PCR Method for Detection of Mycoplasma*

HUO Xin-yang, ZHAO A-gui, SUN Guo-zhu, ZHOU Yu-xun, LI Kai, XIAO Jun-hua[△]

(School of Chemistry and Bioengineering, Donghua University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: To establish a rapid and accurate method to detect mycoplasma, which can not only effectively reduce and prevent mycoplasma pollution, but also provide some guidance value for researchers. **Methods:** Mycoplasma was detected by real-time PCR (TaqMan probe method), and two color TaqMan probes and related primers were simultaneously labeled in the reaction system, which aims to detect mycoplasma DNA and reference gene template, respectively. Primers and probes were designed based on the conserved region of the 16S ribosomal RNA of the mycoplasma and the conserved region of the reference gene TOP3A. The TaqMan probe multiplex quantitative PCR method was established by optimizing the reaction conditions such as primer concentration, probe concentration and annealing temperature, and the specificity, sensitivity and repeatability of the method were verified. **Results:** The standard curve correlation coefficient r^2 was 0.995 and amplification efficiency was 113.36%; the minimum detection limit of this method was 10 copies/ μ L; the intra- group and inter-group coefficient of variation was less than 1%, which suggesting that this method has good specificity. Furthermore, detected 90 samples of cell extract DNA samples using this method. The results showed that 60 cases were positive for mycoplasma, and the positive rate was 67%, which was in agreement with the related research reports. Moreover, three cell culture supernatant samples were detected, and one case was positive for mycoplasma and two cases were negative for mycoplasma. Randomly select 3 positive samples and 2 negative samples from the tested samples using the common PCR Mycoplasma test kit. The results were consistent; the sequencing results were correct. **Conclusions:** The multiplex quantitative PCR mycoplasma detection method established in this study can be applied to the detection of mycoplasma in cell extraction DNA and cell culture supernatant, thereby achieving efficient and rapid detection of mycoplasma.

Key words: Mycoplasma detection; TaqMan; Multiplex quantitative PCR; Sensitivity

Chinese Library Classification(CLC): Q-33; R375; R446.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1259-04

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31772550);上海市科委基金资助项目(17140903102)

作者简介:霍欣洋(1996-),女,硕士研究生,主要研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail: 654523735@qq.com

[△] 通讯作者:肖君华(1968-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:医学分子遗传学,E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn,电话:13052427742

(收稿日期:2019-10-16 接受日期:2019-11-11)

前言

支原体(Mycoplasma)是一类缺乏细胞壁的原核微生物,可在无生命培养基中生长繁殖,其结构简单、个体微小,形态成分枝状或丝状^[1]。自1956年研究人员首次在细胞培养中发现支原体污染以来,支原体污染问题无处不在^[2],相关报道在细胞培养过程中,支原体感染发生率达到了63%^[3]。支原体污染会导致细胞变形,对教学、科研以及生产都会产生严重的影响。支原体检测如肺炎支原体、生殖道支原体等一直以来都是重点关注问题之一^[4-8]。因此,建立一种快速、高效支原体检测方法十分有意义。

支原体污染的检测方法有多种。电子显微镜或相差显微镜观察法,该方法对设备要求严格,检测成本高。DNA荧光染色法,该方法灵敏度太低,ELISA检测法^[9]。目前普遍公认的细胞支原体污染检测方法为分离培养法,但该方法耗时、敏感性低^[10]。Bernet. C等^[11]建立PCR法检测支原体核酸,该方法扩增产物需经电泳后成像观察,操作繁琐,且易造成污染,结果不易判断。多年来PCR技术不断优化,Peredeltchouk. M等^[12]建立RT-PCR方法检测支原体,但该方法在灵敏度提高的同时也增大了交叉污染的风险。世界卫生组织于2015年公布了国际标准统一检测支原体DNA的检测方法^[13]。Laborde. S等^[14]人针对支原体的16SrRNA基因建立了基于荧光探针的实时定量PCR支原体检测方法,国内也有使用此方法检测支原体^[15-18]。核酸检测方法是目前支原体检测应用较多的方法^[19-24]。

本研究利用定量PCR(TaqMan探针法)检测支原体DNA,反应体系中同时存在标记两种颜色TaqMan探针及相关引物,分别检测支原体DNA和参考基因模板。建立了多重定量PCR支原体检测方法,能检测21种支原体,为快速对细胞抽提DNA及细胞培养上清的支原体检测提供新的高效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

细胞抽提DNA来自高校科研单位;细胞培养上清由本实验室培养保存;pGRG36载体购自北京中原公司;7500 Real Time PCR System购自美国Applied Biosystems公司。pMD TM18-T Vector Cloning Kit购自宝生物工程公司;Probe qPCR Super Mix购自近岸蛋白科技有限公司;PCR产物纯化试剂盒、EZ-10柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒、柱式质粒DNA小量抽提试剂盒购自生工生物工程股份有限公司;支原体检测试剂盒withUDG PCR mix购自上海依科赛生物制品有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样本处理 样品若为细胞抽提DNA(无浓度要求)取2 μL作为模板;若样品为细胞培养上清时,取1-1.5 mL细胞培养上清,放入离心管中(13000 r/min, 3 min),取上清,将其稀释10倍后取2 μL作为模板进行定量PCR反应。

1.2.2 引物和探针设计 根据GenBank发表的支原体16S核糖体RNA序列的保守区及参考基因TOP3A(人源)保守区,依照引物及探针设计原则,利用Primer 3.0和Oligo7设计支原体及TOP3A特异性上下游引物及TaqMan探针,能够检测出21种支原体。引物由苏州泓迅生物科技有限公司合成,TaqMan探

针由通用生物系统(安徽)有限公司合成。支原体定量PCR扩增产物NCBI BLAST比对结果显示,可检测出21种支原体。

1.2.3 支原体阳性对照标准品的制备 利用支原体检测试剂盒中阳性对照样本为模板,按照其操作说明获得细胞阳性支原体污染PCR产物。将其物克隆到载体PMD18-T Vector上,得到支原体阳性标准质粒。根据公式DNA拷贝数=质粒浓度(ng/μL)×10⁹/(660×标准质粒碱基数)×阿伏伽德罗常数,计算其DNA的拷贝数,使用鱼精DNA作为溶剂将其拷贝数梯度稀释至10⁴作为支原体阳性标准对照。

1.2.4 参考基因TOP3A标准品的制备 人基因组DNA为模板引入pGRG36酶切位点SmaI及NotI设计上下游引物,PCR扩增获得TOP3A PCR产物,将其克隆到载体pGRG36上,参照Mckenzie G J, Craig N L.(2006)^[25]及依据操作说明书进行转座,构建TOP3A标准大肠杆菌基因组。使用鱼精DNA作为溶剂将其稀释一定倍数后作为参考基因标准对照。

1.2.5 支原体检测多重定量PCR反应 反应体系为20 μL,其中近岸蛋白2×ProbeMix 10 μL,ROX dye II 0.4 μL, Mycoplasma上游引物:5'-TTAAACCACATGCTCCA-3'、下游引物:5'-ATCCGCCTGAGTAGTAT-3';TOP3A上游引物:5'-AGCGACTGTACGAGTTT-ATT-3',下游引物5'-GAGCGATGTCTGATCTCC-3';Mycoplasma TaqMan探针:5'-FAM-CCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCACTC-BHQ1-3'及TOP3A TaqMan探针:5'-HEX-ATTTCTGGCTTGCTGCTCCCA-BHQ1-3',引物浓度及探针浓度为50 μmol/L,分别上样0.2 μL、0.1 μL; TOP3A标准品2 μL,支原体阳性对照标准品2 μL,加DEPC水至20 μL。使用ABI 7500 Real Time PCR System定量检测,反应条件:94℃ 5 min;循环条件:95℃ 15 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,在55℃采集荧光,进行40个循环。

1.3 灵敏度和特异性试验

1.3.1 灵敏度检测 以支原体阳性标准质粒(10⁵ copies/μL-10¹ copies/μL)及稀释800倍的TOP3A标准品大肠杆菌基因组DNA作为模板,检测TaqMan探针双重荧光定量PCR反应的灵敏度。

1.3.2 标准曲线的建立 灵敏度检测实验结束后利用ABI 7500软件标准曲线建立功能,自动生成标准曲线。

1.3.3 统计学分析 以梯度稀释的支原体阳性标准品质粒(10⁵ copies/μL-10¹ copies/μL)及稀释800倍TOP3A标准品大肠杆菌基因组DNA为模板,进行多重定量PCR反应,每个梯度支原体阳性标准品质粒做3重复,分析组内差异,用上述条件进行3次独立重复试验,分析组间差异。数据使用Graoph-Pad Prism5.0软件进行统计学分析。根据以下公式:

变异系数(CV)=标准偏差(SD)/平均数,计算其相应变异系数。

1.4 应用

对细胞抽提DNA样本及细胞培养上清样本使用该方法检测支原体DNA,并使用支原体检测试剂盒PCR-电泳法检测验证及测序验证。

2 结果

2.1 多重定量PCR检测支原体的灵敏度检测

使用 10 倍梯度系列稀释的支原体阳性标准质粒 (10^5 copies/ μL -10 copies/ μL) 及稀释一定倍数倍的 TOP3A 标准品大肠杆菌基因组 DNA 作为模板,检测多重定量 PCR 反应的灵敏度。结果发现多重定量 PCR 检测支原体的灵敏度达 10^2 copies/ μL ,不同浓度支原体标准浓度扩增曲线见图 1。

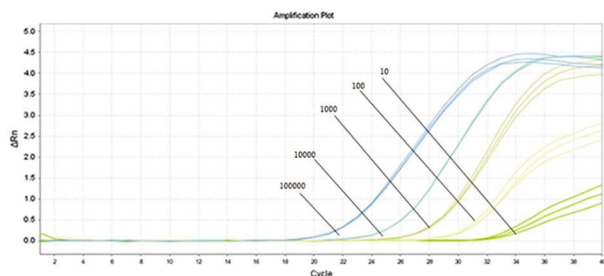


图 1 多重定量 PCR 检测支原体的灵敏度检测结果

Fig.1 Sensitivity for detection of Mycoplasma using multiplex quantitative PCR assay

2.2 多重定量 PCR 检测支原体的标准曲线的建立

5 个浓度梯度支原体标准质粒 Ct 值与其拷贝数的对数构建的标准曲线见图 2。结果表明,支原体标准质粒浓度与 Ct 值之间线性关系良好,相关系数 r^2 为 0.995,扩增效率为 113.364%。标准曲线的线性回归方程为: $Y = -3.038 \times \text{Log}(X) + 36.83$,其中 Y 为 CT 值,X 为支原体标准质粒的拷贝数。

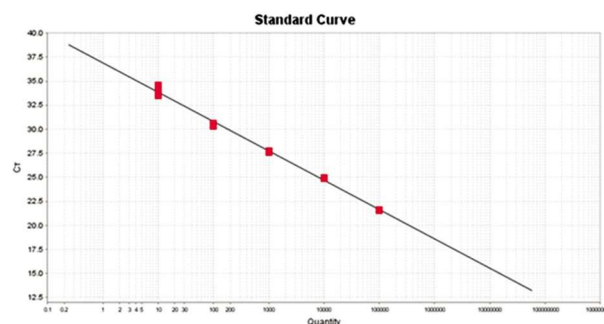


图 2 多重定量 PCR 检测支原体的标准曲线

Fig.2 Standard curve of multiplex qPCR assay for the detection of mycoplasma

2.3 多重定量 PCR 检测支原体的重复性检测

重复性检测结果表明,支原体阳性标准质粒 (10^5 copies/ μL -10 copies/ μL)及稀释一定倍数的 TOP3A 标准品大肠杆菌基因组 DNA 作为模板,组内 C_t 值的变异系数在 0.45-0.84 之间,组间 C_t 值的变异系数在 0.08-0.76 之间,均小于 1%。

2.4 多重定量 PCR 检测支原体方法的应用

2.4.1 细胞抽提样本的检测 支原体多重定量 PCR 方法检测细胞抽提 DNA 样本结果表明,随机选择的 90 例细胞抽提样本中,60 例检测结果呈阳性(C_t 值小于 30),其余 30 例检测结果呈阴性,阳性率为 67%。

2.4.2 细胞培养上清的检测 支原体多重定量 PCR 方法检测细胞培养上清样本结果表明,对本实验室培养的 3 份细胞培养上清样本中,1 份检测结果呈阳性 (C_t 值小于 30),2 份检测结果呈阴性。

2.4.3 检测结果验证 随机挑选一个细胞抽提 DNA 样本,细

胞培养上清 3 例样本使用支原体检测试剂盒检测,两种方法检测结果一致(见图 3),将 PCR 产物送生工测序,测序结果比正确(测序结果图未展示)。

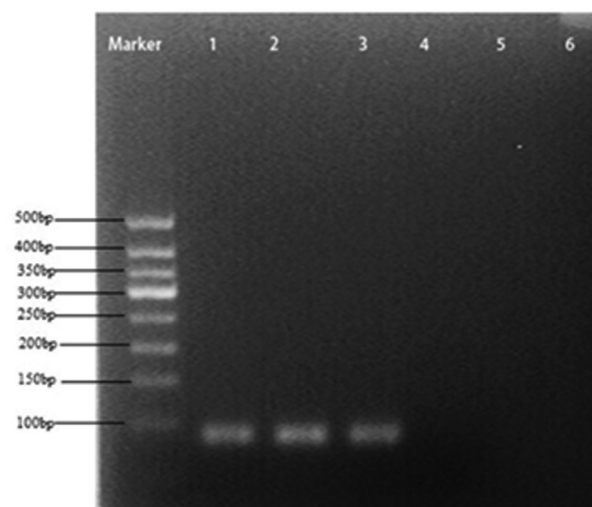


图 3 支原体检测试剂盒检测细胞抽提 DNA 样本及细胞培养上清样本结果

Fig.3 Mycoplasma detection kit detects cell extract DNA samples and cell culture supernatant samples

Note: 1, 2 Cell extracting DNA Sample; 3,4,5 Cell culture supernatant sample, 6 negative control sample.

3 讨论

为实现多重是荧光定量 PCR 检测支原体,利用 TaqMan 探针法,选择两种不同颜色的报告荧光基因分别修饰参考基因、支原体 DNA 的探针,根据支原体 16S 核糖体 RNA 保守区以及参考基因 TOP3A 保守区设计引物和探针,该基因片段涵盖多数的支原体种别,因而可以用于针对多种别的支原体检测,能够实现 21 种支原体检测。本研究通过参考基因的扩增效率可以有效的监控反应体系中的抑制物,检测结果更高效。朱建勋等人建立了山羊支原体定量 PCR 检测方法其灵敏度达 5.96 copies/ μL ^[9],本研究所建立方法检测灵敏度为 10 copies/ μL ,灵敏度相近,远远高于普通 PCR,且本方法可检测出多种种属的支原体。

本研究所建立方法与英聪所建立支原体检测方法比较^[26],定量 PCR 法全程闭馆操作,无需对扩增产物电泳,操作方便,可通过支原体 C_t 值,实现定量检测支原体,给科研人员提供更多的指导信息。目前已报道使用定量 PCR 方法检测支原体^[27-30],但未引入参考基因多重定量 PCR 被报道。本研究通过参考基因的扩增效率可以有效的监控反应体系中的抑制物,将细胞培养上清样本用水稀释 10 倍,若存在支原体污染依然能检测到,检测结果可靠。TaqMan 探针专一性强,与 SYBR Green 染料荧光定量 PCR 方法比较^[27,28],有效的避免采集到非特异性扩增信号,检测结果更加灵敏、高效。

因质粒标准品拷贝数高与检测样本拷贝数差异较大,此外易形成气溶胶造成污染,易造成假阳性。为解决此问题,本研究构建了参考基因标准大肠杆菌基因组,其拷贝数大幅降低,大大减小了污染风险,检测结果更加高效。利用此方法对随机 90

例细胞抽提 DNA 样本检测,支原体阳性率为 67%,与相关研究报道基本一致^[3],这些数据表明,细胞支原体污染较高,十分有必要定期检测培养细胞是否存在支原体污染,本研究建立方法能够高效、快速检测支原体,有较高应用价值。

参考文献(References)

- [1] Xia Qing, Cell bank Mycoplasma detection system and establishment of mycoplasma removal method [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2014
- [2] Zhao Xiang, Feng Jianping, Meng Shufang. Thinking on Nucleic Acid Detection Methods and Method Validation of Mycoplasma Examination[J]. Chinese pharmaceutical affairs, 2018, 32(08): 1020-1027
- [3] Degeling, M.H. Sensitive Assay for Mycoplasma Detection in Mammalian Cell Culture[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(9): 4217-4232
- [4] Barberá M J, Fernández-Huerta M, Jensen J S, et al. Mycoplasma genitalium Macrolide and Fluoroquinolone Resistance: Prevalence and Risk Factors Among a 2013-2014 Cohort of Patients in Barcelona, Spain[J]. Sexually Transmitted Diseases, 2017, 44(8): 457-462
- [5] Staley M, Bonneaud C, McGraw KJ, et al. Detection of Mycoplasma gallisepticum in House Finches (*Haemorrhous mexicanus*) from Arizona[J]. Avian Diseases, 2018, 62(1): 14-17
- [6] Latino M A, Botta G, Badino C, et al. Association between genital mycoplasmas, acute chorioamnionitis and fetal pneumonia in spontaneous abortions [J]. Journal of Perinatal Medicine, 2017, 46 (5): 503-508
- [7] Ling Q, Song Q X, Feng J L, et al. Prevalence of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum infections using a novel isothermal simultaneous RNA amplification testing method in infertile males [J]. Annals of Clinical Microbiology & Antimicrobials, 2017, 16(1): 45
- [8] Waites K B, Xiao L, Liu Y, et al. Mycoplasma pneumoniae from the Respiratory TraCt and Beyond [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2017, 30(3): 747
- [9] Xing Longbin. Prevention and detection of mycoplasma contamination during cell culture[J]. World Chinese Journal of Digestion, 2016, 24(10): 1557-1564
- [10] Huang Haijun, Gao Qishuang, Peng Xia, et al. Establishment and Application of Nested PCR Detection Method for Mycoplasma Cells[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2014, 53(3): 690-693
- [11] Bernet C, Garret M, Barbeyrac B D, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae by using the polymerase chain reaction [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1989, 27(11): 2492-2496
- [12] Peredeltchouk M, David S A W, Bhattacharya B, et al. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(1): 54-60
- [13] C Micha Nübling, Sally A Baylis, Kay-Martin Hanschmann, et al. World Health Organization International Standard To Harmonize Assays for Detection of Mycoplasma DNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(17): 5694-5702
- [14] Cornelissen J B W J, Bree F M D, Wal F J V D, et al. Mycoplasma detection by triplex real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from bovine respiratory disease complex cases [J]. BMC Veterinary Research, 2017, 13(1): 97
- [15] 林裕胜, 李莎莎, 江锦秀, 等. 绵羊肺炎支原体和丝状支原体山羊亚种双重 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(05): 187-194
- [16] 朱建勋, 赵萍, 郝华芳, 等. 山羊支原体山羊肺炎亚种 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用 [J]. 中国兽医科学, 2018, 48(04): 403-411
- [17] 李建, 高航飞, 安维雪, 等. 牛支原体 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(6): 1059-1064
- [18] 韩瑞鑫. 绵羊肺炎支原体检测方法的建立及全基因组生物信息学分析[D]. 内蒙古农业大学, 2018
- [19] Falaganlotsch P, Lopes T S, Ferreira N, et al. Performance of PCR-based and Bioluminescent assays for mycoplasma detection[J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, (118): 31-36
- [20] Hawley J, Yaaran T, Maurice S, et al. Amplification of Mycoplasma haemofelis DNA by a PCR for point-of-care use[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2017, 30(1): 1040638717729187
- [21] Yacui Wang, Yi Wang, Shuting Quan, et al. Establishment and Application of a Multiple Cross Displacement Amplification Coupled With Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor Assay for Detection of Mycoplasma pneumoniae [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019, (9): 325-334
- [22] Hemmatzadeh F, Niap F, Trott D J, et al. A novel quantitative polymerase chain reaction to monitor urinary tract mycoplasma infection in a dog[J]. Letters in Applied Microbiology, 2019, 68(5): 409-414
- [23] Laborde S, Degraeve A, Lehmann D, et al. Detection of Mollicutes in Bioreactor Samples by Real-time Transcription-mediated Amplification[J]. Lett Appl Microbiol, 2010, 50(6): 633-638
- [24] Wisselink H J, Smid B, Plater J, et al. A European interlaboratory trial to evaluate the performance of different PCR methods for Mycoplasma bovis diagnosis[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1)
- [25] McKenzie G J, N L. Craig, Fast, easy and efficient: site-specific insertion of transgenes into enterobacterial chromosomes using Tn7 without need for selection of the insertion event [J]. BMC microbiology, 2006, 6(1): 39-39
- [26] 英聪. 应用 PCR 法检测生物制品中支原体污染[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013
- [27] 丁敏, 张瑞婷, 毛开荣, 等. 应用 SYBR Green Real Time PCR 技术检测细胞培养物中支原体污染 [J]. 畜牧与兽医, 2009, 282(01): 82-85
- [28] Lin Y S, Jiang J X, Zhang J P, et al. Establishment of a SYBR Green I qRT-PCR for Rapid Detection of Mycoplasma mycoides subsp. capri[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018
- [29] Wolff B J, Benitez A J, Desai H P, et al. Development of a multiplex taqMan real-time PCR assay for typing of Mycoplasma pneumoniae based on type-specific indels identified through whole genome sequencing[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2017, 87(3): 203-206
- [30] Tabrizi S N, Su J, Bradshaw C S, et al. Prospective Evaluation of ResistancePlus MG, a New Multiplex Quantitative PCR Assay for Detection of Mycoplasma genitalium and Macrolide Resistance[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(6): 1915-1919