

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.11.037

重组酶聚合酶等温扩增快速检测肺炎支原体方法的建立和初步应用*

杨永强 龙炫辉[△] 魏 涛 邓宁波 桑 晔 唐文志

(广东省中医院珠海医院检验科 广东 珠海 519005)

摘要 目的:建立基于重组酶聚合酶扩增技术(RPA)技术快速检测肺炎支原体的方法。**方法:**本研究以肺炎支原体编码 P1 黏附蛋白为靶基因,利用 Primer Premier 5 软件进行引物、探针的设计,最终筛选出最佳引物。同时设计相应的实时荧光定量 PCR (RT-PCR)引物用于后续的验证试验。对反应体系试剂比例、反应时间、反应温度、引物探针浓度进行确定。肺炎支原体、解脲支原体、人型支原体、肺炎克雷伯菌、肺炎双球菌、大肠杆菌和链球菌作为对照评估 RPA 检测肺炎支原体的特异性及敏感度。**结果:**RPA 快速检测肺炎支原体方法仅需 14 min,检测灵敏度达 200 copies/mL;6 种非肺炎支原体均不能扩增,特异性较高。**结论:**本研究建立了肺炎支原体的 RPA 快速检测方法,具有迅速、简便、经济等优势,为肺炎支原体的快速检测提供一个新的有利工具。

关键词:重组酶聚合酶扩增技术;肺炎支原体;反应体系;建立;应用

中图分类号:R563.15;R446 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)11-2169-05

Establishment and Preliminary Application of Rapid Detection of Mycoplasma Pneumoniae by Recombinase Polymerase Amplification*

YANG Yong-qiang, LONG Xuan-hui[△], WEI Tao, DENG Ning-bo, SANG Ye, TANG Wen-zhi

(Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Hospital of Guangdong Provincial Hospital of traditional Chinese Medicine, Zhuhai, Guangdong, 519005, China)

ABSTRACT Objective: To establish a rapid detection method of mycoplasma pneumoniae based on recombinase polymerase amplification (RPA). **Methods:** In this study, the P1 adhesion protein encoded by mycoplasma pneumoniae was used as the target gene. Primer premier 5 software was used to design primers and probes, and finally the best primers were selected. At the same time, the corresponding real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR) primers were designed for subsequent validation tests. The ratio of reagent, reaction time, reaction temperature and the concentration of primer probe were determined. mycoplasma pneumoniae, ureaplasma urealyticum, mycoplasma hominis, *klebsiella pneumoniae*, *diplococcus pneumoniae*, *escherichia coli* and *streptococcus* were used as controls to evaluate the specificity and sensitivity of RPA in detecting mycoplasma pneumoniae. **Results:** RPA rapid detection of mycoplasma pneumoniae only took 14 minutes, the detection sensitivity was 200 copies/mL; 6 kinds of non mycoplasma pneumoniae could not be amplified, and the specificity was high. **Conclusion:** The RPA rapid detection method of mycoplasma pneumoniae was established in this study, which has the advantages of rapidity, simplicity and economy, and provides a new tool for rapid detection of mycoplasma pneumoniae.

Key words: Recombinase polymerase amplification; Mycoplasma pneumoniae; Reaction system; Establishment; Application

Chinese Library Classification(CLC): R563.15 R446 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)11-2169-05

前言

肺炎支原体(Mycoplasma Pneumonia, MP)是引起非典型肺炎最主要的病原体,它不仅可引起呼吸系统疾病还可导致肺外多系统器官并发症,严重的可导致死亡^[1-3]。目前肺炎支原体感染实验室诊断方法主要是分离培养、血清学、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测技术,由于这些方法自身的缺陷导致临床应用受到限制,无法满足临床诊断需求^[4,5]。重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)是一种新型的恒温扩增技术,在 25~43℃间进行反应,且

反应速度较快,通常从反应起始至结束仅需 5~15 分钟^[6,7]。RPA 技术具有操作简便,设备要求低等优点,已经成为研究热点,目前有很多关于 RPA 在细菌、病毒、真菌等方面研究报道^[8-10],但尚未发现用于 MP 检测的研究。本项目拟应用 RPA 技术开展以下方面的研究:(1)根据肺炎支原体编码 P1 黏附蛋白为靶基因序列设计出最佳引物和探针;(2)反应体系的建立并优化,包括反应体系试剂比例、反应时间、反应温度、引物探针浓度的确定;(3)RPA 检测肺炎支原体的特异性及敏感度的评估。最终建立快速检测肺炎支原体的方法,为肺炎支原体感染的早期诊断提供参考依据。最近几年,RPA 的出现弥补了 PCR

* 基金项目:广东省珠海市科技计划项目(20181117E030063);广东省医学科学技术研究基金项目(A2018522)

作者简介:杨永强(1984-),男,本科,主管技师,研究方向:分子生物学检验与临床输血,E-mail:yangyongqiang125@163.com

[△] 通讯作者:龙炫辉(1986-),男,硕士,主管技师,研究方向:临床微生物学细菌耐药机制,E-mail:longlongh@126.com

(收稿日期:2021-01-05 接受日期:2021-01-28)

反应时热循环不够精准的缺陷,只需在恒温的条件下就能完成核酸分子(RNA)的扩增反应,因此很大程度减少了检测仪器的研发成本。本研究基于 RPA,使用便携式检测设备,完成了对肺炎支原体的快速检测,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源

肺炎支原体标准菌株由珠海迪尔生物工程有限公司提供标准菌株 ATCC15531。收集本院从 2019 年 8 月 -2019 年 10 月 30 个临床样本。

1.2 肺炎支原体 DNA 提取

DNA 提取试剂购置于中山大学达安基因股份有限公司。

严格按照说明书进行 DNA 提取。具体步骤如下:(1)加生理盐水对标准菌株进行稀释;(2)取 50ul 稀释后的样本加入离心管中;(3)加 50 μ L DNA 提取液后震荡混匀;(4)置于恒温金属浴 100℃ 煮沸 10 分钟;(5)14000 转离心 10 分钟后取上清置 -20℃ 冻存备用。

1.3 引物、探针设计

根据肺炎支原体编码 P1 黏附蛋白为靶基因序列利用 Primer Premier5 软件进行引物、探针的设计,根据预实验摸索确定引物及产物长度,经网站数据检索分析给出针对肺炎支原体的特异性进行优化选取最好的引物。设计的上游引物、下游引物和探针序列如表 1。由上海生工生物技术有限公司合成引物。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequences

Primer name	Sequence(5'to3')
MycF8	CCTTCTAATGGAGTTTTTACTTTTCTTTTCAT
MycR6	AAATGTTCTTTCAGAACTGGATACAATCTGACCAA
MycP1	AAACATCAAAATCCATTTATTTATCGGTGGFAHAQTAAACCCAAATCC-C3-spacer
-	Modification:F:FAM-dTH:TetrahydrofuranQ:BHQ1-dT

1.4 反应体系的建立

采用购自杭州众测生物科技有限公司的 RPA 核酸扩增试剂(荧光型)进行实时荧光 RPA 检测,严格按照说明书完成检测。

并采用 ABI7500(美国 AppliedBiosystems 公司)对荧光信号进行检测,根据扩增曲线直接读取检测结果。如图 1 所示。

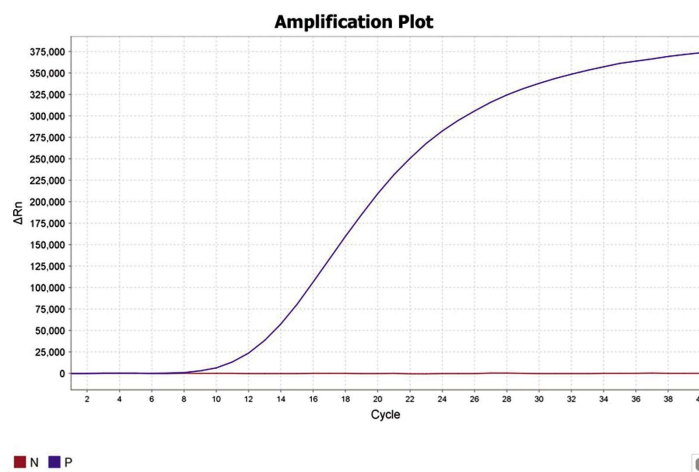


图 1 反应体系的建立

Fig.1 Establishment of reaction system

1.5 主要设备

TGL 16R 台式微量冷冻离心机购自珠海黑马,ABI7500 荧光 PCR 扩增仪(2.0 版本软件)购自美国 AppliedBiosystems 公司,RPA 恒温扩增荧光检测仪 T8(TwistDx 公司)。

1.6 方法

(1)DNA 提取及浓度、纯度测定:采用肺炎支原体标准菌株。购买商品试剂并严格按照说明进行 DNA 提取。(2)反应体系优化:①引物探针浓度优化:RPA 探针的浓度会影响反应的进行,因此我们分别设计 200 nmol/L、300 nmol/L、400 nmol/L、500 nmol/L、600 nmol/L 等几个不同浓度的引物;50 nmol/L、

100 nmol/L、150 nmol/L、200 nmol/L、250 nmol/L 等几个不同浓度的探针,最终选择最佳浓度的引物和探针。②扩增时间的优化:分别在 5、10、15、20、25、30 min 时间观察反应结果,确定最佳扩增时间。③扩增温度的优化:RPA 反应体系可在 25℃ -43℃ 实现靶基因的有效扩增,为了确定最佳反应温度,将肺炎支原体核酸进行系列稀释,作为模板分别在 25、28、31、34、37、40、43℃ 7 个不同温度条件下进行 RPA 扩增,以检测灵敏度最高的扩增温度为 RPA 体系最佳反应温度。

2 结果

2.1 RPA 技术检测肺炎支原体的特异性及敏感度的评估

用我院检验科微生物室日常保留的阳性菌株解脲支原体、人型支原体、衣原体、肺炎克雷伯菌、肺炎双球菌、大肠杆菌和链球菌提取 DNA 后进行扩增作为对照评估其特异性,6 种非肺炎支原体均不能扩增,如图 2 所示。将肺炎支原体核酸样本进行 8 份稀释: 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 、 2×10^1 copies/mL,分别作为模板,以最优反应条件行检测,确定最

小检出量来评估敏感性,检测灵敏度达 200 copies/mL,如图 3 所示。将 40 份标本分两次同时进行检测,检测重复性,均能检出且重复性较高,如图 4 和图 5 所示。

2.2 临床样本验证

留取临床低值阳性样本进行了初步验证,能有效检出,如图 6 所示。

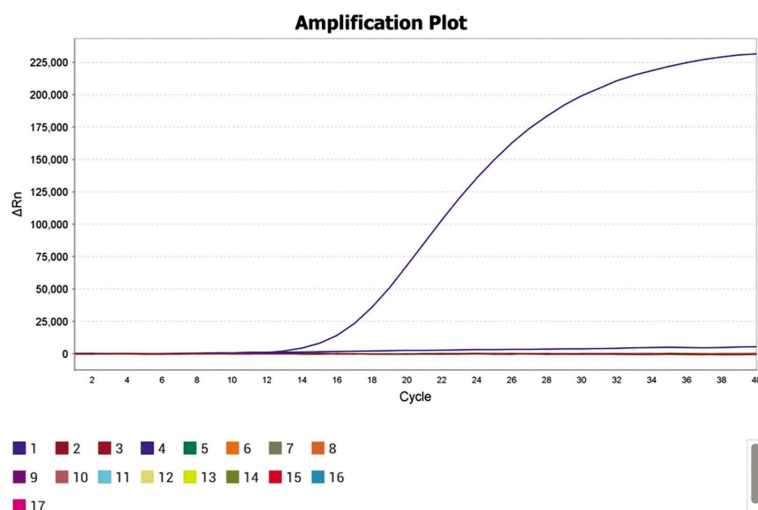


图 2 肺炎支原体的 RPA 技术检测特异性

Fig. 2 Specificity of RPA for mycoplasma pneumoniae

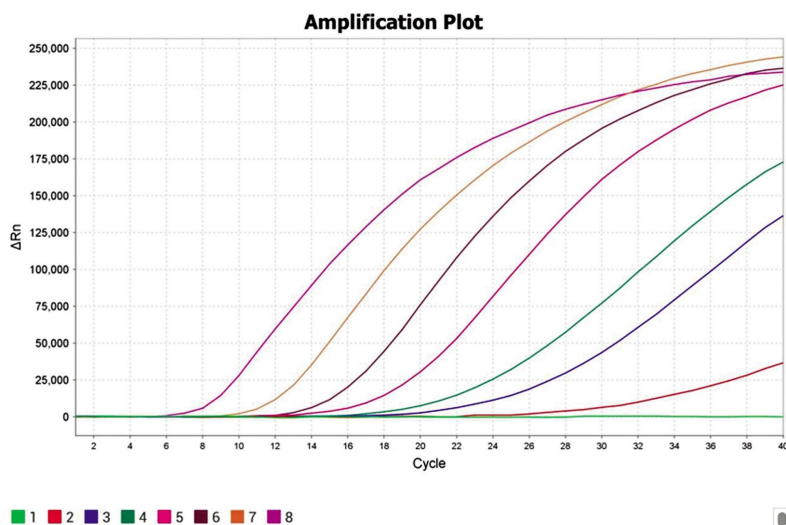


图 3 肺炎支原体的 RPA 技术检测敏感性

Fig.3 Sensitivity of RPA for mycoplasma pneumoniae

3 讨论

肺炎支原体感染实验室诊断方法主要是分离培养、血清学检测、PCR 检测技术。分离培养检测结果最可靠是肺炎支原体感染的诊断金标准,但由于 MP 本身培养比较困难且培养时间通常需要 5-14 天,因此分离培养并不适合快速检查及常规检测。目前 MP 感染的实验室诊断主要依靠血清学检查,最明确的血清学证据采集双份标本检测,观察免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 类抗体是否有明显上升,另一方面虽然免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 类抗体是感染早期最常见

的抗体,但是有些患者,在其初次感染或再次感染时可能不产生 IgM 类抗体,血清学检测属于回顾性检测,假阳性或假阴性结果较多,临床应用有一定的局限^[11-13]。PCR 检测法虽然特异性、灵敏性都很高,但它对仪器设备要求较高且操作繁琐,价格昂贵,普及率不高,无法满足临床快速诊断的需求^[14-17]。

随着分子生物学的发展,恒温扩增技术的出现摆脱了 PCR 的预热 - 变性 - 退火 - 延伸等反应时热循环不够精准的缺陷,仅在恒温的条件下就能实现 RNA 的扩增反应,并且技术操作简便,设备要求低,检测时间较短^[18-20]。目前已有 10 余种核酸恒温扩增技术,其中 RPA 是一种新型的恒温扩增技术,RPA 无需

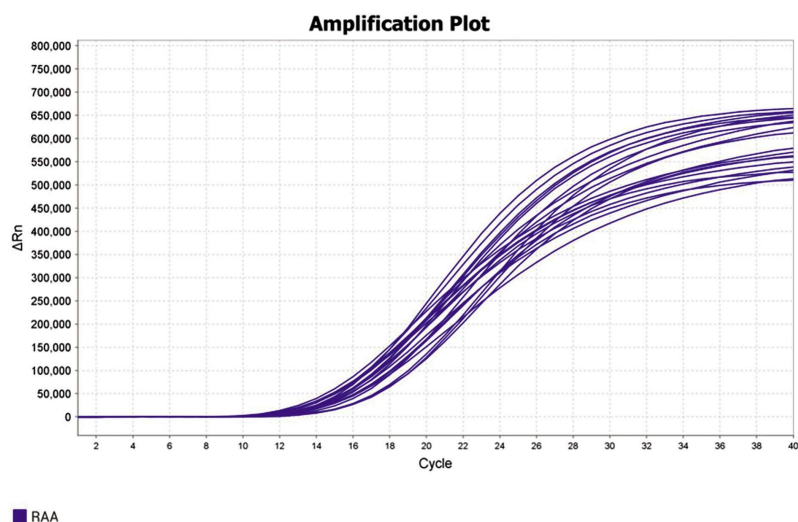


图 4 肺炎支原体的 RPA 技术检测重复性
Fig. 4 Repeatability of RPA detection of mycoplasma pneumoniae

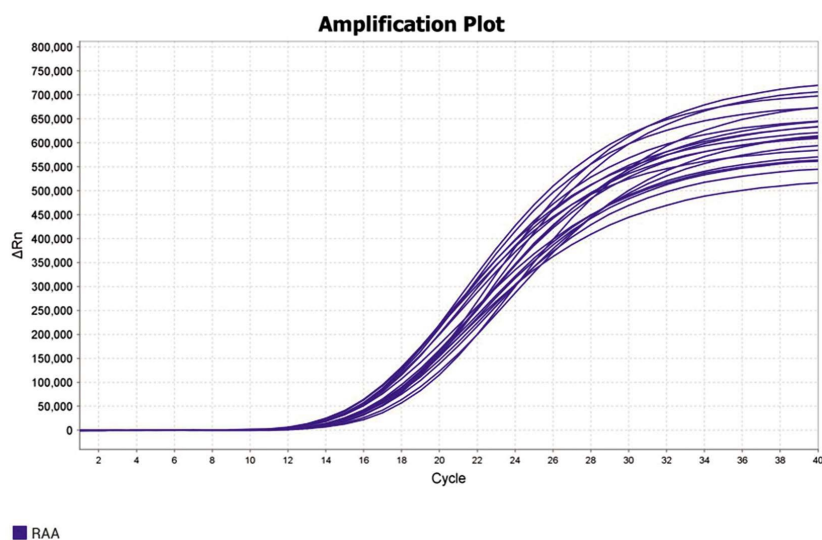


图 5 肺炎支原体的 RPA 技术检测重复性
Fig. 5 Repeatability of RPA detection of mycoplasma pneumoniae

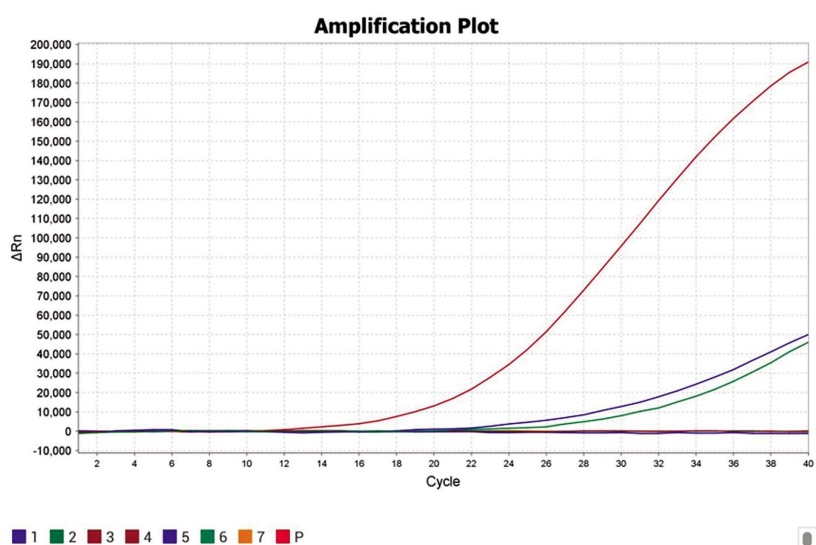


图 6 肺炎支原体的临床样本检测
Fig. 6 Detection of clinical samples of mycoplasma pneumoniae

较高或精准的温度,在 25~42℃ 间均可进行反应,且反应速度较快,通常从反应起始至结束仅需 5~15 分钟,扩增的产物可通过免疫金标记技术(immunogold labelling technique)或实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR)、琼脂糖凝胶电泳等进行检测,备受国内外学者关注^[21-24]。科学家们先后将此技术应用用于各种人类基因组、寄生虫基因组等核酸扩增。最近几年,病毒专家也开始关注此技术,建立了人类免疫缺陷病毒等 RNA 扩增检测方法。国内也有利用 RPA 技术开展有关研究,如结核杆菌、曲霉菌的检测,但尚未发现用于肺炎支原体检测的开发研制。因此本研究拟 RPA 为核心技术研究建立一种快速、高特异性、高灵敏性的肺炎支原体检测方法^[25,26]。

从 2006 年首次报道后,RPA 就已在临床诊断、食品致病菌等检测分析及生物安全方面得到广泛应用。尤其是于 2014 年英国 TwistDx Inc 公司开发的重组酶聚合酶商业化试剂盒的问世直接推动 RPA 技术突飞猛进的发展。RPA 相比其他核酸扩增技术存在较多的优点,并且其解决了当前分子技术存在的难题:(1)RPA 可快速反应,样品加入反应体系时就开始反应,无需解链目标双链 DNA;(2)RPA 是在恒温下进行反应,整个反应只需 10-20 min 完成且无需变性,很大程度减少了反应时间,且极大地减少了检测成本;(3)目标基因不存在 DNA 或 RNA 的局限性,甚至还可进行 RNA 病毒的检测;(4)RPA 与基于 DNA 探针的荧光检测技术相融合,对快速 RNA 检测具有十分重要的意义。当前 RPA 被广泛应用于病原微生物的检测。RPA 融合了血清学检测和分子技术的优势,是一种简便快速、经济的检测手段,RPA 技术被称作有望替代 PCR 的核酸检测技术。RPA 关键技术是引物和探针的设计。引物的设计不可只根据序列来判断引物的扩增性能,需对候选引物进行筛选,引物的筛选分为下述几个步骤:选择靶标区域,设计并筛选候选引物,提高引物的扩增性能再次筛选,这部分可根据 TwistDx 公司提供的引物筛选指南,最终引物的确定需要不断地筛选。RPA 反应探针的浓度也需筛选,一个反应体系中通常需添加 120nm/L 探针,偶尔稍微调整探针浓度可加速反应,所以可在一定浓度范围内对探针浓度进行优化从而找到最佳浓度^[27,28]。

本课题组已成功地掌握引物、探针筛选方法和设计反应体系,并建立了 RPA 快速检测肺炎支原体方法,仅需 14min,检测灵敏度达 200copies/ml 且特异性较高。但还存在以下缺陷:(1)方法的稳定性有待提高,通过预实验本课题组已掌握了 RPA 关键技术,须进一步优化反应体系,使反应条件完善到最优状态;(2)由于该方法的敏感性高容易产生携带污染导致假阳性,可以采用封闭式反应管和一步加样的方法,并尝试在反应管中加入尿嘧啶 DNA 糖基酶降解反应体系中的小片段 DNA 从而消除污染。

综上所述,本研究建立了肺炎支原体的 RPA 快速检测方法,具有迅速、简便、经济等优势,为肺炎支原体的快速检测提供一个新的有利工具。

参考文献(References)

- [1] Chen N, Shi J, Huang J, et al. Impact of air pollutants on pediatric admissions for Mycoplasma pneumonia: a cross-sectional study in Shanghai, China[J]. BMC Public Health, 2020, 20(1): 447
- [2] Roshan S, Tan SW. A case report of severe mycoplasma pneumonia with autoimmune haemolytic anaemia [J]. Med J Malaysia, 2020, 75(5): 600-602
- [3] Nagata T, Odawara K, Hosoyama S, et al. MERS type II mimicking leukoencephalopathy was suspected to be associated with mycoplasma pneumonia infection [J]. Rinsho Shinkeigaku, 2020, 60(5): 328-333
- [4] 冯志山,李贵霞,郭映辉,等.儿童肺炎支原体感染血清学与分子生物学检测方法的对比研究[J].河北医科大学学报, 2019, 40(7): 829-833
- [5] 闫文芳. PCR 快速检测技术在肺炎支原体感染中的应用研究 [J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(18): 234-235
- [6] Kojima K, Juma KM, Akagi S, et al. Solvent engineering studies on recombinase polymerase amplification[J]. J Biosci Bioeng, 2021, 131(2): 219-224
- [7] 施奕,徐昌平,余蓓蓓,等.重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J].病毒学报, 2020, 36(3): 522-532
- [8] 葛志毅,周建华,尚佑军,等.一种侧流试纸结合 FAM 重组酶聚合酶扩增(RPA)诊断布鲁氏菌感染的方法[J].中国人兽共患病学报, 2019, 35(10): 905-908
- [9] 周树青,杨栋,金敏,等.重组酶聚合酶扩增技术(RPA)快速检测 G II 型诺如病毒[J].解放军预防医学杂志, 2020, 38(1): 76-78
- [10] 龙炫辉,杨永强,魏涛,等.实时荧光重组酶聚合酶扩增快速检测临床常见曲霉菌方法的建立 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(16): 3189-3192
- [11] 张宁,陆东明,顾猛.肺炎支原体抗体 IgG、IgM 和 DNA 检测在儿童呼吸道感染中的诊断价值 [J]. 检验医学与临床, 2020, 17(10): 1398-1400
- [12] 徐丹.免疫球蛋白 IgM、IgG、IgA 水平检测对肺炎支原体感染患儿的诊断价值[J].实用检验医师杂志, 2017, 9(4): 244-245
- [13] 张亚兰,王建利,王静利,等.肺炎支原体特异性 IgG、IgM 检测在呼吸道感染中的临床意义[J].河北医科大学学报, 2016, 37(1): 97-99
- [14] 赵康辰,葛以跃,崔仓标,等.重组酶聚合酶扩增结合横向流体试纸条快速检测人腺病毒[J].中华实验和临床病毒学杂志, 2017, 31(4): 357-361
- [15] Daher RK, Stewart G, Boissinot M, et al. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications [J]. Clin Chem, 2016, 62(7): 947-958
- [16] Raja B, Goux HJ, Marapadaga A, et al. Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of common bacterial urinary tract infection pathogens [J]. J Appl Microbiol, 2017, 123(2): 544-555
- [17] 岳苑,张建中,张茂俊. NASBA 和 RPA 两种等温扩增技术在病原菌检测中的应用研究[J].中华流行病学杂志, 2019, 40(8): 1018-1022
- [18] Higgins O, Smith TJ. Loop-Primer Endonuclease Cleavage-Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology for Multiplex Pathogen Detection and Single-Nucleotide Polymorphism Identification[J]. J Mol Diagn, 2020, 22(5): 640-651
- [19] James AS, Alawneh JI. COVID-19 Infection Diagnosis: Potential Impact of Isothermal Amplification Technology to Reduce Community Transmission of SARS-CoV-2 [J]. Diagnostics (Basel), 2020, 10(6): 399
- [20] 柴国祥,李兴芳,韩斌孝,等.实时荧光核酸恒温扩增检测技术对痰标本中结核分枝杆菌的诊断价值[J].中国现代医学杂志, 2020, 30(11): 39-42

- [20] Lv WW, Zhang JJ, Zhou XL, et al. Safety of combining vascular endothelial growth factor receptor tyrosine-kinase inhibitors with chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019 98(23): e15806
- [21] Saito H, Fukuhara T, Furuya N, et al. Erlotinib plus bevacizumab versus erlotinib alone in patients with EGFR-positive advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NEJ026): interim analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(5): 625-635
- [22] 熊志成, 刘洋, 孙鑫, 等. 奥希替尼联合贝伐珠单抗治疗伴 EGFR T790M 突变肺癌的疗效与机制研究 [J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(15): 744-749
- [23] Seto T, Azuma K, Yamanaka T, et al. Randomized Phase III Study of Continuation Maintenance Bevacizumab With or Without Pemetrexed in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: COMPASS (WJOG5610L)[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(8): 793-803
- [24] Nasralla A, Lee J, Dang J, et al. Elevated preoperative CEA is associated with subclinical nodal involvement and worse survival in stage I non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Cardiothorac Surg*, 2020, 15(1): 318
- [25] Yang-Chun F, Min F, Di Z, et al. Retrospective Study to Determine Diagnostic Utility of 6 Commonly Used Lung Cancer Biomarkers Among Han and Uygur Population in Xinjiang Uygur Autonomous Region of People's Republic of China[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(18): e3568
- [26] Dal Bello MG, Filiberti RA, Alama A, et al. The role of CEA, CYFRA21-1 and NSE in monitoring tumor response to Nivolumab in advanced non-small cell lung cancer (NSNSCLC) patients [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 74
- [27] Ramalingam SS, Dahlberg SE, Belani CP, et al. Pemetrexed, Bevacizumab, or the Combination As Maintenance Therapy for Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: ECOG-ACRIN 5508[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(26): 2360-2367
- [28] Reck M, Shankar G, Lee A, et al. Atezolizumab in combination with bevacizumab, paclitaxel and carboplatin for the first-line treatment of patients with metastatic non-squamous non-small cell lung cancer, including patients with EGFR mutations [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2020, 14(2): 125-136
- [29] Thatcher N, Goldschmidt JH, Thomas M, et al. Efficacy and Safety of the Biosimilar ABP 215 Compared with Bevacizumab in Patients with Advanced Nonsquamous Non-small Cell Lung Cancer (MAPLE): A Randomized, Double-blind, Phase III Study [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(7): 2088-2095

(上接第 2173 页)

- [21] Mohandas A, Bhat AI. Recombinase polymerase amplification assay for the detection of piper yellow mottle virus infecting black pepper [J]. *Virusdisease*, 2020, 31(1): 38-44
- [22] Jarvi SI, Atkinson ES, Kaluna LM, et al. Development of a recombinase polymerase amplification (RPA-EXO) and lateral flow assay (RPA-LFA) based on the ITS1 gene for the detection of *Angiostrongylus cantonensis* in gastropod intermediate hosts [J]. *Parasitology*, 2021, 148(2): 251-258
- [23] Yang X, Zhao P, Dong Y, et al. An improved recombinase polymerase amplification assay for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* with lateral flow strips [J]. *J Food Sci*, 2020, 85(6): 1834-1844
- [24] 梁君妮, 尹伟力, 谢爽, 等. 重组酶聚合酶扩增技术快速检测鲤春病毒血症病毒(SVCV)方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(10): 1037-1040
- [25] 凌莉, 席静, 王莹, 等. 重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测创伤弧菌 [J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(4): 73-76
- [26] 马磊, 曾繁文, 丛锋, 等. 小鼠诺如病毒逆转录重组酶聚合酶扩增检测方法的初步建立[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(5): 853-859
- [27] Kober C, Niessner R, Seidel M. Quantification of viable and non-viable *Legionella* spp. by heterogeneous asymmetric recombinase polymerase amplification (haRPA) on a flow-based chemiluminescence microarray[J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 100: 49-55
- [28] 严春霞, 陆伟宏, 何国产, 等. 环介导等温扩增在检测肺炎支原体中的临床应用[J]. *中国医学科学院学报*, 2019, 41(2): 203-207