

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.11.026

基因芯片快速鉴定分枝杆菌菌种方法的建立*

唐曙明, 李爱敏, 陈海霞, 杨自华[△]

(深圳市人民医院检验科, 广东深圳 518000)

[摘要] **目的** 利用基因芯片技术, 建立一种能快速、准确鉴定分枝杆菌菌种的方法, 并验证其临床应用价值。**方法** 根据 23 种分枝杆菌基因序列设计特异性探针并制作基因芯片, 通过 PCR-反向点杂交鉴定 23 种分枝杆菌标准菌株、9 种非分枝杆菌和 103 株分枝杆菌临床分离株的菌种。**结果** 应用基因芯片技术检测 23 种分枝杆菌标准菌株和 9 种非分枝杆菌菌株, 特异性为 100%。103 株临床分离株经鉴定 87 株为结核杆菌复合群(MTC); 16 株为非结核分枝杆菌(NTM), 其中脓肿分枝杆菌 5 株、胞内分枝杆菌 3 株、鸟分枝杆菌 3 株、偶发分枝杆菌 2 株, 以及堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌、戈登分枝杆菌各 1 株。103 株临床分离株鉴定结果与测序法完全一致, 该方法最低检出限为 10^3 copy/mL。**结论** 采用基因芯片技术能快速鉴定分枝杆菌菌种, 并区分 MTC 和 NTM, 具有简便快速及准确性、特异性、灵敏度高的优点。

[关键词] 分枝杆菌属; 菌种鉴定; 寡核苷酸序列分析

[中图分类号] R446.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)11-1516-03

Establishment of a rapid and accurate gene microarray for identifying Mycobacterium species*

Tang Shuming, Li Aimin, Chen Haixia, Yang Zihua[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a rapid and accurate method for the identification of Mycobacterium species by the gene microarray and to verify its clinical application value. **Methods** According to the gene sequence of 23 species of Mycobacteria, the specific probes were designed and the gene chips were prepared. 23 Mycobacterial standard strains, 9 non-mycobacterial strains, 103 clinically isolated mycobacterial strains were detected by PCR-based reverse blot hybridization assay in the gene chip. **Results** 23 mycobacterial standard strains, 9 non-mycobacterial strains were detected by gene chip, the results showed that the specificity was 100%. Of 103 mycobacterial clinically isolated strains, 87 strains were identified as Mycobacterium tuberculosis compounds (MTC) and 16 strains as non-tuberculosis mycobacteria (NTM) including 5 strains of *M. abscessus*, 3 strains of *M. intracellulare*, 3 strains of *M. avium*, 2 strains of *M. fortuitum*, 1 strain of *M. kansas*, 1 strain of *M. marinum* and 1 strain of *M. gordonae*. The identification results of 103 clinically isolated strains were completely consistent with the sequencing results. The lowest detection limit by this method was 10^3 copies/mL. **Conclusion** The gene microarray technique for rapidly identifying Mycobacteria and differentiate MTC and NTM has the advantages of simpleness, rapidness, high accuracy, high specificity and high sensitivity.

[Key words] mycobacterium; species identification; oligonucleotide array sequence analysis

近年来, 中国分枝杆菌疫情不断上升, 尤其是非结核分枝杆菌 (non-tuberculous mycobacteria, NTM) 感染增多趋势明显。2010 年第五次全国结核病流行病学抽样调查结果显示, NTM 在分枝杆菌分离菌株中占比高达 22.9%, 相比 1990 年的 4.9%, 涨幅超过 360%。NTM 病和结核病有着相似的临床表现, 但对药物的敏感性完全不同, 若当成结核病用药, 其耐药率为 95.9%; 耐多药率为 83.7%, 往往导致治疗失败^[1-3]。因此, 建立一种快速、简便的分枝杆菌菌种鉴定方法以及时、准确地鉴定分枝杆菌菌种, 对诊断、控制和治疗分枝杆菌感染引起的疾病具有重要的意义。随着分子生物学技术的不断发展, 基因芯片检测技术得到了广泛应用。基因芯片技术因其高通量、平行性、快速灵敏、样品用量少等优点为病原菌的分子诊断提供了有力的技术平台。将基因芯片技术应用于分枝杆菌菌种鉴定中, 可实现对多种分枝杆菌的平行海量检测, 从而提高病原菌的检出效率。本研究建立基于基因芯片技术的检测方法, 对临床分枝杆菌分离株进行了检测, 并以测序法为“金标准”, 探讨其临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 23 种分枝杆菌标准株购于中国生物制品检定所, 具体菌株见表 1。同时还购买了 9 种非分枝杆菌标准株 (大肠埃希菌、肺炎链球菌、卡他布兰汉菌、红色红球菌、星形奴卡菌、绿脓假单胞菌、肺炎克雷伯菌、表皮葡萄球菌、草绿色链球菌)。103 株分枝杆菌临床分离株来自本院 2012 年 2~8 月门诊和住院患者。

1.1.2 仪器与试剂 PCR 仪购于美国 ABI 公司; 电泳仪购于北京六一仪器厂; 核酸/蛋白凝胶图像管理系统型号为 GSG-2000; 分子杂交箱购于韩国 FINE PCR 公司。

1.1.3 探针设计 根据 23 种常见致病性分枝杆菌的基因序列, 在其 16S~23S rRNA 基因间隔区设计 PCR 引物和特异性探针。每种菌株均设计多组探针, 经比较分析后, 最终选择的探针序列见表 1。另设一条保守区序列作为内控点 (内对照), 以监测整个实验过程的有效性。

1.2 方法

1.2.1 基因芯片制备 尼龙纤维膜浸入 5% EDAC 20 min, 纯水洗膜, 晾干。探针稀释液 ($5 \mu\text{m}/\text{L}$) 点样于膜条上, 晾干后浸于 0.1 mol/L NaOH 3 min, 纯水洗膜, 晾干, 室温储藏备用。

1.2.2 分枝杆菌核酸制备 分枝杆菌标准株和临床分离株、

* 基金项目: 深圳市科技局资助项目 (201102151)。 作者简介: 唐曙明 (1975—), 副主任技师, 硕士研究生, 主要从事分子诊断技术研究。

[△] 通讯作者, Tel: 13590265712; E-mail: tangshuming@126.com。

表 1 23 种分枝杆菌特异性探针序列

分枝杆菌	探针序列	分枝杆菌	探针序列
耻垢分枝杆菌	TTTCGATGGACTGCCAGACACAC	蟾蜍分枝杆菌	GGCAGTAACCGCCGCACACTGTT
胞内分枝杆菌	GGCCCTGAGACAACACTCGGTCTG	浅黄分枝杆菌	TTTCGGGGTGTGTGGTGCAGTCA
堪萨斯分枝杆菌	ACACTCGGGCTCTGTTCGAGAGT	草分枝杆菌	GAGACAACAGGCCCGTTCGGCCCT
龟分枝杆菌	TGTGGTCTTTGACTTATGGATAG	戈登分枝杆菌	GACGAAGACCGGGTGCACGACAACA
海分枝杆菌	AATTGGATGCGCTGCCTTTTGGT	次要分枝杆菌	GATGTCGTTGAGCTTGCTGTGGTG
偶发分枝杆菌	TGTGGGTGGGGCTGGTTTTGTGT	金色分枝杆菌	GCCCGGGTTTCCGGGTGGCTCCGCG
土分枝杆菌	CTGAGGCAACAGGCCCGTTTGTGC	溃疡分枝杆菌	TGCGCAACAGCAAGCAAGCCAGAC
不产色分枝杆菌	GTTGTTGCCCATTCGCGGTGGG	母牛分枝杆菌	TGCACAACAACAAGCAAGCCAGACG
结核分枝杆菌	GACTTGTTCAGGTGTTGTCCAC	苏尔加分枝杆菌	AACACTCAGGCTTGCCAGAGCT
鸟分枝杆菌	TCTTCGTGGCCGGCGTTCATCGAA	迪氏分枝杆菌	ATCTAAATGGACGCGTCGCCGGTGC
瘰疬分枝杆菌	CTAAACGGATGCGTTGCCGGAAC	猿猴分枝杆菌	TGAACGCGTCGCCGGAACGGTTA
脓肿分枝杆菌	AGCATCTAAACATAGCCTCGCTC		

非分枝杆菌标准菌株悬液直接离心,痰液样本经消化、离心后收集沉淀,将沉淀进行裂解、煮沸、离心,取上清液备用。

1.2.3 引物设计及 PCR 扩增 将 Genebank 中的分枝杆菌核酸序列进行比对分析,设计可以特异性扩增 23 种常见致病性分枝杆菌的特定片段作为引物对,引物的 5' 进行生物素标记。在 25 μ L 反应体系中,dNTP 混合物的终浓度为 0.2 mmol/L,引物的终浓度均为 0.4 μ mol/L,DNA 模板的终浓度为 20 ng, Taq DNA 聚合酶 2.5 U。置于 PCR 仪上扩增,然后在 2% 琼脂糖凝胶中电泳检测扩增产物。

1.2.4 杂交与显色 将制备好的膜条编号后放入 15 mL 杂交管中,加入扩增产物和 6 mL 杂交缓冲液(2 \times SSC、0.1% SDS)置于沸水浴 10 min,放入已预热的杂交箱中,57 $^{\circ}$ C 杂交 1.5 h。取出膜条,移至装有预热至 57 $^{\circ}$ C 的洗液(0.5 \times SSC、0.1%SDS)50 mL 管中,于 57 $^{\circ}$ C 轻摇洗涤 15 min。取出膜条,按杂交缓冲液:POD=2 000:1 配制孵育液,室温轻摇孵育 30 min,弃去 POD 溶液。用杂交缓冲液室温轻摇洗 2 次,每次 5 min。用柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L)室温洗膜 2 min,同时配制显色液(19 mL 0.1 mol/L 柠檬酸钠、1 mL 2 mg/mL TMB、10 μ L 3% H₂O₂),将膜条浸泡于显色液中避光显色 10~15 min,观察结果。

1.2.5 结果分析 膜条在内控点(CC)位置出现蓝色斑点提

示本次检测过程正常;其他出现的蓝色斑点表示为相应的分枝杆菌菌种。

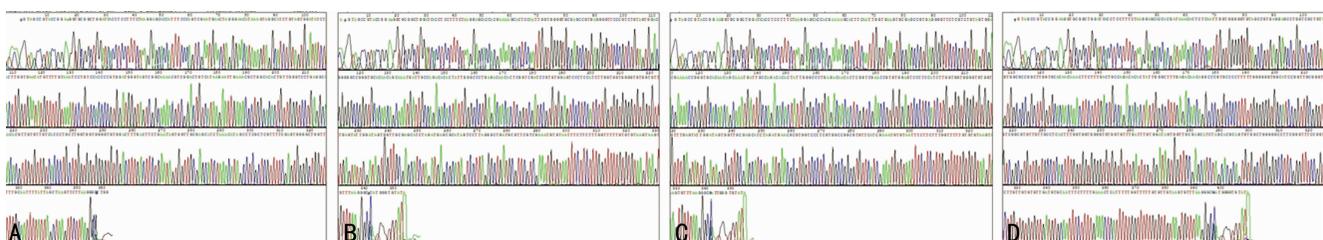
1.2.6 确定最低检出限 23 种分枝杆菌标准菌株先用结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(凯杰生物, careTM TB PCR AS-SAY)定量后进行系列稀释,分别制成 10⁴、10³、10²、10¹ copy/mL 的菌液,按 1.2.2~1.2.5 步骤检测,以确定新建方法的最低检出限。

1.2.7 测序分析 经芯片鉴定为 NTM 的临床分离株进一步送上海英骏生物技术有限公司进行测序,以检测 PCR 扩增的特异性和芯片鉴定结果的准确性。

2 结 果

2.1 基因芯片检测结果 用基因芯片对 103 株分枝杆菌临床分离株进行检测,分别检出 87 株结核杆菌复合群(MTC)和 16 株 NTM。在 16 株 NTM 中,分别检出 5 株脓肿分枝杆菌、3 株胞内分枝杆菌、3 株鸟分枝杆菌、2 株偶发分枝杆菌、1 株堪萨斯分枝杆菌、1 株海分枝杆菌、1 株戈登分枝杆菌。

2.2 测序鉴定结果 将 16 株经基因芯片鉴定为 NTM 的临床分离株送上海英骏生物技术有限公司进行 DNA 测序。测序结果与 GeneBank 中已报道的序列进行比对分析,芯片鉴定结果和测序结果完全一致。部分 NTM 测序结果,见图 1。



A:脓肿分枝杆菌;B:胞内分枝杆菌;C:鸟分枝杆菌;D:偶发分枝杆菌。

图 1 部分 NTM 测序结果

2.3 基因芯片的准确性与特异性 基因芯片与 23 种分枝杆菌标准菌株的扩增产物均可进行杂交反应,检测准确性为 100%;9 种非分枝杆菌标准菌株扩增产物与基因芯片上的探针均不杂交,检测特异性为 100%。

2.4 基因芯片最低检出限的确定 对 23 种分枝杆菌标准菌株系列稀释菌液进行检测,各菌株浓度在 10³ copy/mL 时检测结果仍为阳性;当菌液稀释至 10² copy/mL 时,MTC、鸟分枝杆菌、偶发分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌等 19 种菌株的阳性显色已经明显变弱,而海分枝杆菌、戈登分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、胞内分枝杆菌的检测结果为阴性;当菌液浓度稀释至 10¹ cop-

y/mL 时,所有膜条未见显色,结果见表 2。

表 2 部分分枝杆菌标准株不同浓度的检出结果(copy/mL)

菌种	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
结核杆菌复合群	阳性	阳性	阳性	阴性
鸟分枝杆菌	阳性	阳性	阳性	阴性
偶发分枝杆菌	阳性	阳性	阳性	阴性
堪萨斯分枝杆菌	阳性	阳性	阳性	阴性

续表 2 部分分枝杆菌标准株不同浓度的
检出结果 (copy/mL)

菌种	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
海分枝杆菌	阳性	阳性	阴性	阴性
戈登分枝杆菌	阳性	阳性	阴性	阴性
脓肿分枝杆菌	阳性	阳性	阴性	阴性
胞内分枝杆菌	阳性	阳性	阴性	阴性

3 讨 论

NTM 引起的感染日益增多,特别是由其引发的医院感染出现频率逐渐增高,已越来越受到人们的关注^[4-6]。快速、准确、灵敏、特异地对致病性分枝杆菌做出诊断,是有效预防分枝杆菌病发生和控制其迅速传播的前提和关键,对治疗和疫情控制具有重要意义。传统的分枝杆菌筛查方法主要有涂片抗酸染色法、罗氏培养基培养法和结核抗体金标法,其中抗酸染色涂片法具有简便、快捷、价格低廉的优点,但其敏感性太低;而罗氏培养基培养法报告时间较长(2~8 周);结核抗体金标法则只能检测结核分枝杆菌,对 NTM 检测无效。后期发展的 BACTEC 快速菌种鉴定法可初步鉴别 MTC 和 NTM,但其培养周期仍较长(2~6 d),有研究对 BACTECTB460 检测出来的 NTM 进行菌种鉴定,发现有 7.7% 的菌株为结核分枝杆菌^[7]。随着分子生物学技术的飞速发展,PCR-单链构象多态性方法也被应用于分枝杆菌菌种鉴定,该方法通过分析分枝杆菌 16S rRNA,根据其电泳图谱与标准株的相似性进行菌种鉴定,但结果显示对结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌及堪萨斯分枝杆菌、胃分支杆菌之间不能特异性区分^[8]。前述方法敏感性或特异性不强,很难满足临床诊断的需要。

基因芯片技术是伴随人类基因组计划的实施而发展起来的一门新兴技术,该技术将成千上万个 DNA 或寡核苷酸片段固定在玻璃、尼龙膜或硅片等载体上,与标记的样品杂交,分析样品中基因表达、基因序列、基因突变和多态性变化等情况。该技术将 PCR 技术的高灵敏度和反向点杂交技术的高特异性相结合,真正达到了快速检测的要求,其结果更加准确可靠。本研究以测序法为对照,采用本院与亚能生物技术(深圳)有限公司联合研发的分枝杆菌菌种鉴定试剂盒,利用膜芯片技术,在膜上固定一系列的特异性探针,根据分枝杆菌 16S~23S rRNA 基因间隔区序列设计引物,利用 PCR 体外扩增各菌株的 DNA,与固定在膜上的基因型特异探针杂交,再通过显色判断分枝杆菌菌种。实验结果显示,本研究中基因芯片上的探针只与 23 种分枝杆菌的扩增产物杂交,与 9 种非分枝杆菌标准株扩增产物均不杂交,为进一步验证本芯片的准确性,将 16 株临床 NTM 进行 DNA 测序,证实与 GenBank 对应序列相一

致,其检测特异性达到了 100%。据报道,基因芯片检测灵敏度比 PCR-电泳法高 10 倍^[9-10],从本研究对 23 种类型的分枝杆菌标准菌株的系列稀释检测结果可以看出,该方法的最低检出限达到了 10³ copy/mL,解决了传统方法对临床标本中低浓度分枝杆菌不能检出的难题,提高了检测灵敏度。

上述实验结果显示,本研究所建立的基因芯片法具备高通量、高特异性、高灵敏度、操作简便、结果直观的优点,且能在 6~8 h 内直接测定痰液标本中的 MTC 和其他 22 种 NTM,具有很好的临床应用价值,是一项值得推广的技术。

参考文献

- [1] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-507.
- [2] Wu X, Yang Y, Zhang J, et al. Comparison of antibody responses to seventeen antigens from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(19): 1520-1528.
- [3] 张翊,卢建平,叶森. 四种结核分枝杆菌检测方法的临床应用评价[J]. 中国防痨杂志, 2006, 28(1): 14-17.
- [4] Somoskovi A, Mester J, Hale YM, et al. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria [J]. *Clin Chest Med*, 2002, 23(6): 585-597.
- [5] 朱晓娥,袁耿彪. 基因芯片技术在基因突变诊断中的应用及其前景[J]. 重庆医学, 2010, 39(22): 3128-3131.
- [6] Sumi S, Radhakrishnan VV. Diagnostic significance of humoral immune responses to recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with pleural tuberculosis [J]. *J Clin Lab Anal*, 2010, 24(5): 283-288.
- [7] 赵亭,潘欣. 应用 BACTEC 460TB 系统区分出的非结核分枝杆菌进一步菌种鉴定意义的探讨[J]. 中国防痨杂志, 1998, 20(1): 29-31.
- [8] 吴雪琼,张俊仙,刘佳文,等. PCR-SSCP 分枝杆菌菌种初步鉴定方法的建立及其应用[J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(7): 25-26.
- [9] 翟俊辉,宋亚军,杜宗敏,等. 通用基因芯片检测感染性细菌方法的研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 430-431.
- [10] Jeda A, Witek A, Janikowska G, et al. Expression profile of genes associated with the histaminergic system estimated by oligonucleotide microarray analysis HG-U133A in women with endometrial adenocarcinoma [J]. *Ginekol Pol*, 2014, 85(3): 172-179.

(收稿日期:2014-10-28 修回日期:2015-01-20)

(上接第 1515 页)

of *Escherichia coli*, *Sallmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009, 63(1): 1-9.

- [12] 姜侃,吕沁风,汪新,等. 三重 LAMP 法检测食品中沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学, 2013, 34(24): 182-187.
- [13] 许邹亮,南文龙,周洁,等. 布鲁氏菌环介导等温扩增(LAMP)可视化检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(8): 37-40.

- [14] Kaneko H, Iida T, Aoki K, et al. Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella zoster virus DNA by Loop-mediated isothermal amplification [J]. *Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3290-3296.

- [15] Deng X, Qi X, Gao NY, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of reticuloendotheliosis virus [J]. *J Virol Methods*, 2010, 16(8): 82-86.

(收稿日期:2014-11-01 修回日期:2015-01-16)