

doi:10.11816/cn.ni.2016-161671

• 论 著 •

应用重组酶介导的恒温扩增法建立检测非结核分枝杆菌的方法研究

陈淑丹¹, 刘伟², 罗鹏¹, 郑伟¹, 吕沁风¹, 吴忠华¹

(1. 浙江出入境检验检疫局检验科, 浙江 杭州 310003; 2. 杭州市疾病预防控制中心结核病防治所, 浙江 杭州 3100021)

摘要: 目的 建立一种恒温条件下简便快速的非结核分枝杆菌核酸检测方法, 为临床指标提供参考依据。方法设计包括海分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌 3 种非结核分枝杆菌的特异性引物, 采用重组酶介导恒温扩增技术, 建立高效快速的非结核分枝杆菌检测方法。结果 重组酶介导恒温扩增荧光反应在 39 °C 下进行约 20 min 即可得到检测结果; 重组酶介导恒温扩增技术检测 3 种非结核分枝杆菌的检测下限可达 10³ 拷贝/μl, 与结核分枝杆菌以及其他临床常见病原菌均无交叉反应, 检测特异性为 100.0%; 对临床相应的非结核分枝杆菌均能很好的检测。结论 该方法为非结核分枝杆菌检测提供了一种可在简便环境中特异、灵敏的快速检测手段。

关键词: 非结核分枝杆菌; 结核杆菌; 重组酶介导扩增; 恒温

中图分类号: R378.91⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1005-4529(2016)23-5329-04

Application of recombination enzyme mediated constant temperature amplification method in detection of non-tuberculous mycobacteria

CHEN Shu-dan*, LIU Wei, LUO Peng, ZHENG Wei, LYU Qin-feng, WU Zhong-hua

(* Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou, Zhejiang 310003, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish a simple and quickly nucleic acid detection method for detecting non-tuberculosis *Mycobacterium* under the condition of constant temperature, so as to provide reference for clinic. **METHODS** Specific primers for non-tuberculosis *Mycobacterium* were designed, including primers for *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium abscess* and *Mycobacterium Kansas*, and using recombinase-aid amplification (RAA) technology to establish efficient and rapid method for non-tuberculosis *Mycobacterium* (NTM) detection. **RESULTS** The whole amplified fluorescence reaction of RAA was completed within 20 min under 39°C. The lowest detection limit of RAA method for detecting three kinds of NTM was 103 copies per microliter, the detection specificity was 100%. There were no cross reaction for detecting MTB or other clinical pathogenic bacteria. For clinical corresponding NTM, there were very good positive detection results. **CONCLUSION** The RAA method of NTM detection provides a kind of specific, sensitive and rapid detection in easy environment.

Key words: Non-tuberculosis *Mycobacterium*; *Mycobacterium tuberculosis*; recombinase-aid amplification; Constant temperature

世界上大多数国家都有发现非结核分枝杆菌感染患者。近年来,非结核分枝杆菌(NTM)病疫情呈现上升趋势。我国 1990 年对 27 个省、市、自治区进行第三次全国结核病流行病学抽样调查的结果表明,NTM 总感染率为 15.4%,其中感染率最高的省份为浙江省,海南省次之^[1]。2010 年第 5 次全国结核病流行病学调查表明,NTM 分离率为 22.9%,较 1990 年 15.4%明显上升^[2]。非结核分枝杆菌的疫情上升直接对临床医疗技术和方案提出挑战,因为

大多数非结核分枝杆菌对一线抗结核药物耐药,又与结核病临床症状相似,容易造成误诊^[3-4]。为应对 NTM 病日趋增多的形势,提高对 NTM 病的诊断与防治水平,减少 NTM 对人类生命健康的威胁,本研究建立一种重组酶介导实时荧光恒温扩增检测 3 种非结核分枝杆菌的方法,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 样品及来源 临床结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌核酸标本由杭州市疾病预防控制中心提供,临床微生物菌株核酸由浙江大学附属第一医院惠

赠。

1.2 探针和引物设计 选取堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌和脓肿分枝杆菌为目的菌株,分别在 NCBI 数据库中找出相应菌种的基因序列。经过比对确定

堪萨斯分枝杆菌和海分枝杆菌选取 16-23 rRNA ITS 基因序列为目的基因设计引物和探针,脓肿分枝杆菌选取 23s rRNA 序列为目的基因设计引物和探针,见表 1。

表 1 三种非结核分枝杆菌的引物和探针序列

Table 1 Primers and the probe sequences of three kinds of non-tuberculosis *Mycobacteria*

引物名称	序列(5'-3')	扩增大小 (bp)
KAN	F:AGCATCCCAACAAGTGGGGTGCAAGCCGTGA R:CTCGCAACCCTATCCAATTCTCAAACACCAC P:CTATTGGGTCTCTGAGGCAACACTCGGGC(FAM-dT)C(THF)G(BHQ-dT)TCGAGAGTTGTCC(phosphate)	189
MAR	F: CGAGAAACACTCCAATTGGTGGGGTGTAAAGC R:CAACAGAACACGCCACCAAAAAGGCAGCGCA P:CACTATTGGGTCTCTGAGGCAACATCTCTG (FAM-dT)T(THF)G(BHQ-dT)TTCGGGATGTTGTC (phosphate)	194
ABS	F:ATCACCTCCTTTCTAAGGAGCACCATTTCCAG R:CAGCCYACTCGAAAACGAGCGAGGCTATGT P:GTGGRTACTACTTGGTGAATATGTTTTG(FAM-dT)A(THF)A(BHQ-dT)CCTGTCCACCCG(phosphate)	294

注:KAN. 堪萨斯分枝杆菌引物名称;MAR. 海分枝杆菌引物名称;ABS. 脓肿分枝杆菌引物名称。

1.3 重组酶介导恒温扩增检测 NTM 反应体系优化 先进行重组酶介导恒温扩增(RAA)检测 NTM 反应体系优化。1.5 ml 离心管中分别加入 25 μl 反应缓冲液 A, 2 μl 正向引物, 2 μl 反向引物, 1 μl 模板, 加 17.5 μl 双蒸水至 47.5 μl, 涡旋混匀, 然后加入到有干粉的反应管中, 再次混匀。每个反应管最后加入 2.5 μl 280 mM 醋酸镁溶液并混匀。将上述反应管放置在 37 °C (35~42 °C) 条件下反应 40 min。反应结束后, 将反应管取出, 每个反应管中加入 50 μl 酚/氯仿(1:1), 振荡均匀, 12 000 rpm 离心 1 min。吸取 10 μl 上层溶液进行琼脂糖凝胶电泳(胶浓度一般为 1.5~2.0%), 检测结果。

1.4 重组酶介导恒温扩增实时荧光检测 NTM 采用了江苏奇天生物科技有限公司的反应试剂盒。根据说明书, 反应在 50 μl 体系中进行, 反应体系包括反应缓冲液 2 μl 420 nM 正向引物、2 μl 420 nM 反向引物、2 μl 120 nM 探针、1 μl DNA 模板, 加双蒸水至 47.5 μl, 将上述混合均匀, 加入到 RAA 荧光反应干粉管中, 使干粉重悬均匀, 瞬时离心。再向每个反应管中加入 2.5 μl 280 mM 醋酸镁溶液, 混匀并离心。将上述反应溶液加入荧光检测仪中, 39 °C 反应 20 min。阴性对照以双蒸水代替核酸。

1.5 灵敏度实验 设计合成目的 DNA 序列, 构建含有目的检测片段的质粒 DNA。提取质粒 DNA, 并计算其拷贝数, 分别稀释到 10⁷ 拷贝/μl、10⁶ 拷贝/μl、10⁵ 拷贝/μl、10⁴ 拷贝/μl、10³ 拷贝/μl、10² 拷贝/μl, 检测反应体系的灵敏度。

1.6 特异性实验 提取临床常见微生物标准株和

临床分离株 DNA 进行检测。临床标准株包括大肠埃希菌 ATCC25922, 金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 铜绿假单胞菌 ATCC25853, 粪肠球菌 ATCC2521; 临床分离株采集自不同患者, 种类包括金黄色葡萄球菌、溶血葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、产气肠杆菌、粘质沙雷菌、铜绿假单胞菌、鲍氏不动杆菌、嗜麦芽假单胞菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌; 以及分离自临床不同患者的结核分枝杆菌及 BCG 菌株。

1.7 临床样本检测 非结核分枝杆菌包括堪萨斯分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、海分枝杆菌。

2 结果

2.1 RAA 反应体系优化 在进行临床样本测试前, 先进行 RAA 反应体系优化。采用 DNA 电泳结果筛选优化条件。见图 1。

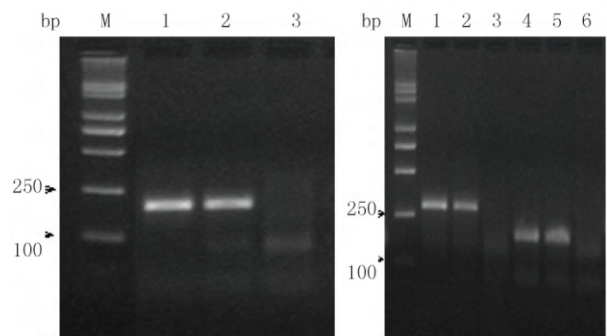


图 1 不同种的非结核分枝杆菌扩增电泳图

Figure 1 Electrophoretogram for different kinds of non-tuberculosis *Mycobacterium*

2.2 灵敏度实验 所有的扩增在 20 min 之内完成;随着拷贝数的降低,起峰的时间延迟,起峰的强

度也逐渐减少。最低可对 1 000 个拷贝的质粒 DNA 分子进行扩增,见图 2~4。

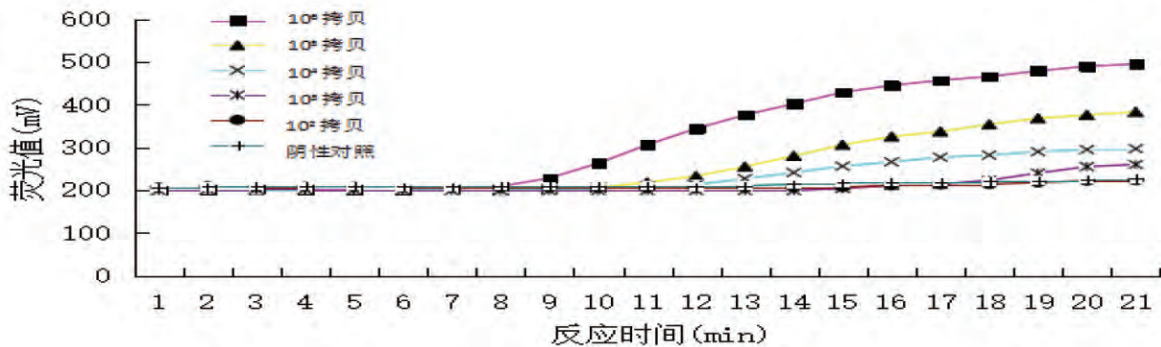


图 2 不同浓度堪萨斯分枝杆菌 16-23 rRNA ITS 基因的扩增图

Figure 2 Amplification of *Mycobacterium kansas* 16-23 rRNA ITS in different concentrations

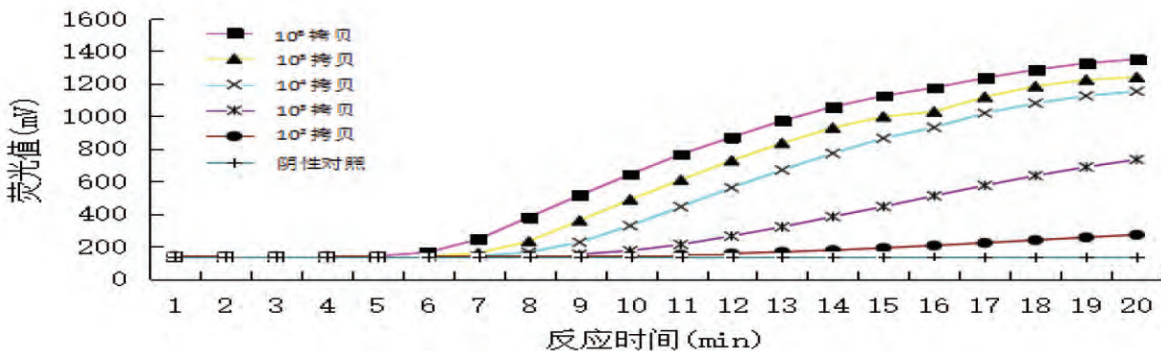


图 3 不同浓度脓肿分枝杆菌 23s rRNA 基因的扩增图

Figure 3 Amplification of *Mycobacterium kansas* 23s rRNA ITS in different concentrations

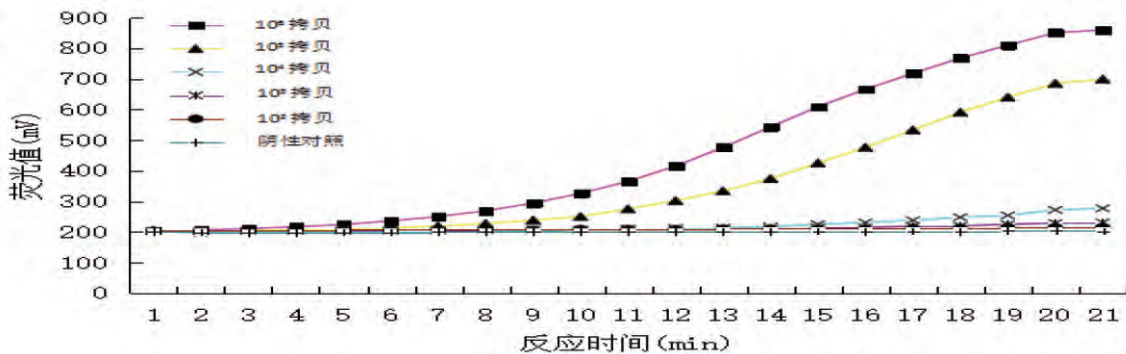


图 4 不同浓度海分枝杆菌 16-23 rRNA ITS 基因的扩增图

Figure 4 Amplification of *Mycobacterium marinum* 16-23 rRNA ITS in different concentrations

2.3 特异性检测 用建立的 RAA 法分别扩增临床 27 株常见细菌、6 株真菌、鸟胞内分枝杆菌 2 株、偶发分枝杆菌 2 株、龟分枝杆菌 3 株和 70 株结核分枝杆菌复合群的 DNA,均无荧光增值,未得到阳性扩增结果。同时用相应的引物和方法对相应的临床非分枝杆菌包括堪萨斯分枝杆菌菌株 5 株、脓肿分

枝杆菌 6 株、海分枝杆菌 3 株进行检测,分别得到阳性扩增结果,反应的特异性为 100%。以脓肿分枝杆菌的荧光扩增为例,见图 5。

3 讨论

我国是全球结核病高负担国家之一,当患者痰

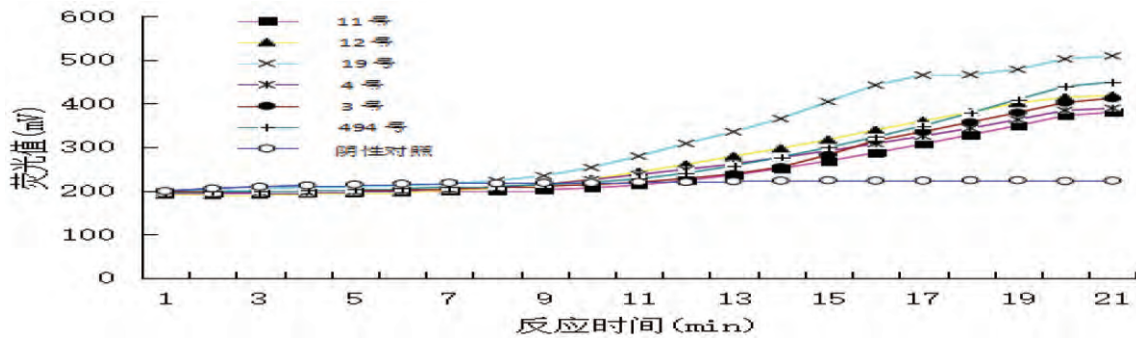


图 5 RAA 检测脓肿分枝杆菌临床菌株扩增图

Figure 5 Amplification of *Mycobacterium abscess* in clinic detected by RAA

涂片检查发现抗酸杆菌 (AFB), 又具有临床相关症状及影像学改变时, 常被诊断为涂阳肺结核而开始抗结核治疗。尽管有一线的抗结核药物和卡介苗免疫, 但每年患病的人数仍不断增加, 仍有一些患者疗效欠佳, 除考虑有患者免疫力差, 原发耐药性的可能以及治疗方案不合理和患者对治疗的依从性差等因素外^[5], 还需考虑有无非结核分枝杆菌肺病的可能。近年来医源相关性 NTM 病逐渐增多; 如血液透析、静脉导管相关性血行感染、手术或注射部位的 NTM 感染等。

长期以来, 培养法检测分枝杆菌被视为诊断结核病和非结核病的金标准, 其检测结果常作为评价新型 MTB 和 NTM 检测试剂的金标准。但该方法操作繁琐、费时 (>4 周)、所需样品量大、重复性差, 且对新出现的菌种不能进行准确高效地鉴定。与培养检测方法比较, 核酸检测技术具有快速和敏感度高的优势。但常规的 PCR 技术由于热循环的需要, 使这一技术完全依赖于电源和昂贵的 PCR 仪器, 从而限制了这一技术在实验室之外的应用。

目前最接近所谓常温核酸扩增技术是重组酶聚合酶扩增法 (RPA), 该方法是以 T4 噬菌体 DNA 复制机理系统为蓝本, 系统中除了需要一种常温下能工作的 DNA 聚合酶外, 还包含一个噬菌体 *uvsX* 重组酶和一个单链 DNA 结合酶 (*gp32*), 以及另外一个辅助 *uvsX* 重组酶的 *uvsY* 蛋白。如果效仿 RT-PCR 利用简易荧光仪, 还需另一个蛋白的帮助。该系统的显著优点在于, 它在常温下就能实现 DNA 解链并可在 15~30 min 内完成目的 DNA 的快速扩增。所以 RPA 扩增技术就不需要使用贵重的核酸扩增仪, 因而也不受样品槽孔多少和空间的限制。

重组酶介导扩增 (RAA) 技术尚是一种新出现的在恒温下可以使核酸快速扩增的方法, 在国内尚无产品应用。与其他恒温核酸扩增方法不同的是,

RAA 扩增法采用来自于大肠杆菌的 *recA* 重组酶, 利用 *recA* 重组酶在常温下可以与 DNA 紧密结合的特性, 并结合引物形成聚合体扫描双链 DNA, 在与引物同源的序列处使双链 DNA 解旋。在单链结合蛋白 (SSB) 和 DNA 聚合酶的作用下, 新的 DNA 片段可以在体外快速地扩增出来。这个体外 DNA 扩增的过程不需要高温, 一般在 37 °C 或者室温下反应 15~30 min 即可得到与传统高温 PCR 相同的目的片段。整个反应简单快速, 因为不需要高温循环, 常温下即可完成所有的反应步骤, 室温低于 25 °C 时, 增加一台水浴设备即可, 所以特别适合在有大量样品的非实验室检测场所使用。

本研究中根据非结核分枝杆菌各种基因的序列特征, 建立了一种 RAA 法检测 7 种非结核分枝杆菌的方法。该方法可应用于口岸卫生检疫、疾控中心等, 为其提供现实可行的快速传染病分子生物学诊断技术, 制备相应的检测试剂盒。为常温核酸扩增技术真正应用到口岸一线打下技术基础。

参考文献

[1] 中华医学会结核病分会. 非结核分枝杆菌病诊断与处理[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(11): 650-653.

[2] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组. 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): 485-508.

[3] Jing H, Wang H, Wang Y, et al. Prevalence of nontuberculous mycobacteria infection, China, 2004-2009[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(3): 527-528.

[4] Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(4): 367-416.

[5] Liao TL, Lin CF, Chen YM, et al. Risk factors and outcomes of nontuberculous mycobacterial disease among rheumatoid arthritis patients: a case-control study in a TB endemic area [J]. Sci Rep, 2016, 6: 29443.