

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.003

一种随机引物联合多特异性 DNA 片段检测结核分支杆菌的新方法 *

黄威 邢益平[△] 严有德 严玉娟 艾月梅

(南京医科大学第一附属医院感染科 江苏南京 210029)

摘要 目的:针对目前结核性疾病实验室诊断的局限性,探索一种更为敏感和特异的结核分枝杆菌 DNA 检测新方法。**方法:**选取 10 株江苏地区流行的结核分支杆菌(MTB)菌株,选取临床其他常见菌株及分枝杆菌菌株作为对照组,分别提取 DNA 作为随机引物的模板。参考国内、外文献设计 12 条随机引物,并分别对 MTB 及对照菌株进行单个引物随机扩增,2% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行分离并切胶纯化,通过 TA 克隆将纯化片段连接到质粒 pEASYTM-T5 Zero 并进行测序,通过 BLAST-nr 比对验证是否为 MTB DNA 片段。按照所确定的 MTB 片段序列,在其内部设计、合成一对特异性引物。用此特异性引物扩增对应的随机引物扩增产物,获得 MTB 特异性条带图谱。并将该方法检测的敏感性和特异性与临幊上常用的 real-time PCR 进行比较。**结果:**经 BLAST-nr 比对,随机引物 IS986F, S535 及 IS986R 扩增的条带与 MTB DNA 有高度同源性(均为 99%)。随机引物 IS986F, S535 和 IS986R 分别联合其特异性引物可以检测稀释 10^5 倍、 10^5 倍和 10^3 倍的 MTB DNA, 其特异性分别为 100%、90% 和 80%。常规 real-time PCR 可检测出稀释 10^4 倍的 MTB DNA。**结论:**随机引物 IS986F 联合其特异性引物检测结核分枝杆菌的灵敏度和特异性优于 S535, IS986R 两组,特异性为 100%,且灵敏度优于常规 real-time PCR 法。

关键词:结核分支杆菌; RAPD; 特异性 DNA 片段; PCR**中图分类号:**R378.911 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)29-5609-08

Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* by Random Combined Specific PCR*

HUANG Wei, XING Yi-ping[△], YAN You-de, YAN Yu-juan, AI Yue-mei

(Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To explore a more sensitive and specific molecular biology method for the diagnosis of tuberculosis disease, on account of the limitation of currently laboratory diagnosis of tuberculosis. **Methods:** Ten strains of *Mycobacterium tuberculosis* (2×10^5 - 2×10^6 /ml) being popular in Jiangsu area were extracted. DNA was diluted according to 1:10 series dilution as templates to evaluate sensitivity. Specificity were evaluated using the related bacteria and *Mycobacterium* as control. Referring to the relevant domestic and foreign literature, twelve random primers were selected for RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). 12 tubes of RAPD products were run by electrophoresis in 2% agarose gel stained with DuRed and visualized in UV light. The high brightness and clear bands were selected and excised from the 2% agarose gel by means of Gel-out kit. The products were extracted and cloned into the TA cloning vector (pEASYTM-T5 Zero) and sequenced. The sequences obtained were blasted against the NCBI database to verify whether a MTB DNA fragment or not. A pair of MTB specific primers were designed and synthesized according to the determined sequence. The specific primers based PCR were performed using RAPD products as temples. The specific MTB bands were showed by PAGE. The sensitivity and specificity were compared between this novel method and routine real-time PCR test in our hospital. **Results:** Three DNA sequences from bands amplified with the random primer IS986F, S535 and IS986R and MTB sequence from BLAST-nr were highly homologous. MTB DNA diluted in 1:10⁵ can be detected by random primer IS986F combined its internal specific primers with 100% of specificity. MTB DNA diluted in 1:10⁵ can be detected by random primer S535 combined its internal specific primers with 90.0% of specificity. While MTB DNA diluted in 1:10³ can be detected by random primer IS986R combined its internal specific primers with 80% of specificity. MTB DNA diluted in 1:10⁴ can be detected by routine real-time PCR. **Conclusion:** A new method for the detection of MTB based randomly combined specific PCR has been developed and has more sensitivity than routine real-time PCR with 100% of specificity.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; RAPD; Specific DNA fragment; PCR**Chinese Library Classification(CLC):** R378.911 **Document code:** A**Article ID:**1673-6273(2014)29-5609-08

* 基金项目:2011 年江苏省医学创新团队基金项目(LJ201121)

作者简介:黄威(1987-),男,硕士研究生,主要研究方向:神经系统感染性疾病,

电话:18262636327, E-mail:huangweiwin@yeah.net

△通讯作者:邢益平,教授, E-mail:xingyiping2010@vip.com

(收稿日期:2014-03-12 接受日期:2014-04-08)

前言

结核病(TB)是由结核分枝杆菌感染引起的慢性传染病。目前全国结核病每年发病人数约为130万,15岁及以上人群活动性肺结核的患病率为459/10万,其中痰涂片阳性患者的肺结核率66/10万,菌培养阳性肺结核患病率119/10万^[1]。

结核病细菌学诊断是结核病诊断的“金标准”,在传统的病原学诊断方法中,临床标本涂片、抗酸染色、镜检虽简便、快速,但检测的灵敏度低^[2]。传统细菌培养耗时长,新的Bectec MGIT-960系统最快也要8天^[3]。血清结核抗体检测的灵敏度和特异性不理想^[4];PPD(结素的纯蛋白衍生物)含有许多分支杆菌共同抗原,故特异性差^[5]。新的IFN-γ释放试验虽然比结核菌素试验更具特异性,却无法辨别活动性结核和潜伏感染,对免疫抑制的患者的结核诊断评估有限^[6]。相比传统的细菌学检查,PCR技术灵敏度高,检测时间短,对血液、尿液、胸水和脑脊液等标本的检测有着更为明显优势。

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)技术是由Williams等和Welsh等两个研究小组在1990年创建的一种基于PCR技术之上的,可对整个基因组进行多态性分析的分子技术。基本原理为:不同物种的基因组中与随机引物相匹配的碱基序列的空间位置和数目都可能不同,因而使用一系列具有10个左右碱基的单链随机引物,对目标基因组的DNA进行PCR扩增,其扩增产物的大小和数量也可能不同从而反应物种的多态性。该技术简便易行,能对5万到30亿碱基包括病毒、细菌,甚至植物和人类基因产生独立的指纹图谱^[7,8]。国内外已有学者应用RAPD技术分析结核杆菌的菌株变异,耐药性的产生与转导,及流行病学调查等研究。但这些研究均以分离获得的菌株为前提,不能用于临床诊断。本研究首先利用RAPD技术强大的基因扩增能力,先通过单个随机引物对MTB DNA部分的基因组放大,以达到增加检测敏感性的目的。在此基础上设计一对特异性的内引物进行2次PCR扩增,获得特异性基因片段的组合图谱,以提高检测的特异性,从而达到快速有效诊断结核性疾病的目的。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

10株结核分枝杆菌由南京市胸科医院提供(编号分别为13060775、13060804、1306886、1306856、1306863、1306934、1306947、1306991、13072659、13072664)。金黄色葡萄球菌(27H7)、肺炎链球菌(56G2)、大肠埃希氏杆菌(29G1)、肺炎克雷伯杆菌(29A6)、铜绿假单胞菌(37G9)、流感嗜血杆菌(32D7)、白色念珠菌(27J2)、新型隐球菌(27G9)均来自江苏省人民医院检验科;麻风分支杆菌(thai-53)、鸟分支杆菌(bj-6)来自中国医学科学院皮肤病研究所。

1.2 菌株DNA提取

将所得结核分枝杆菌稀释成浓度为 $2\times 10^8\sim 2\times 10^6$ 个/mL的菌液,向1.5mLEP管加入1mL菌液。离心5000×g 10分钟,弃上清。再加入180μL浓度为20mg/mL的溶菌酶(sigma公司),37℃孵育30分钟。处理好后按DNA抽提试剂盒(QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook)说明书进行结

核分枝杆菌DNA的提取(结核分枝杆菌MTB DNA的浓度为3.08ng/μL,OD 260/280=1.88)。对照组的细菌用相同的试剂盒进行DNA抽提并储存于-20℃(所有对照组细菌提取的DNA在实验前全部稀释到和结核分枝杆菌MTB相一致的浓度)。

1.3 随机引物PCR(RAPD-PCR)

依据国、内外文献中设计12条用于研究结核分枝杆菌DNA多态性的随机引物(见表1),并交于上海生工生物工程有限公司合成。反应体系:随机引物(10 μM)2 μL,模板5 μL(实验组:10倍梯度稀释的MTB DNA,阴性对照组:金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希氏菌、肺炎克雷伯杆菌、铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌、白色念珠菌、新型隐球菌、麻风分支杆菌及鸟分支杆菌的DNA,空白对照组:ddH₂O),2×Taq PCR Master Mixs(购自TIANGEN公司)12.5 μL,用ddH₂O补至25 μL。反应条件:94℃3 min,45个循环94℃1 min、36℃1 min、72℃1 min,72℃终末延伸7 min;RAPD-PCR产物放于4℃短期保存。扩增产物用2.0%的琼脂糖凝胶电泳分离,核酸染料为DuRed(泛博生化)。PCR仪型号为9600(Applied Biosystems)。

1.4 RAPD条带的回收、克隆和测序

选取RAPD-PCR产物中条带清晰且较亮的15条条带进行割胶纯化(Cycle-Pure Kit,OMEGA),纯化后的PCR产物进行TA克隆(pEASYTM-T5 Zero Cloning Kit,全式金公司,测序引物M13F-TGTAAAACGACGGCCAGT,)将连接产物转化到Trans1-T1感受态细胞,通过含氨苄培养基筛选,挑单克隆进行扩增,所得菌液送于上海华津公司测序。

1.5 序列分析及特异性引物的设计

将所得测序的DNA序列在NCBI上应用BLAST程序进行同源性检索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),挑出匹配率高的DNA序列并利用Primer3设计一对相应的特异性引物,由上海生工生物工程有限公司合成。

1.6 特异性引物PCR

25 μL反应体系:上、下游引物(10 μM)各1 μL,模板5 μL(随机引物PCR产物进行10倍稀释),2×Taq PCR Master Mixs1 2.5 μL,用ddH₂O补至25 μL。反应条件:94℃3 min,30个循环94℃30 s、60℃30 s、72℃1 min,终末延伸7 min。

1.7 Real-time PCR

按照结核分枝杆菌检测试剂盒(购自中山大学达安基因股份有限公司)说明操作。

2 结果

2.1 随机引物PCR图谱

根据扩增的条带图谱,引物MTBC-RT,IS986F,IS986R,INS-2,S535,ERIC-2均能扩增出明亮且清晰可辨条带分别为3、1、7、1、1、2共计15条条带(如图1黑箭头所示)。

2.2 高同源性DNA序列的选定、特异性内引物的设计及其扩增结果

测序结果表明第8泳道随机引物IS986F扩增的250 bp的片段(GenBank:CP002884),第9泳道随机引物IS986R扩增的549 bp的片段(GenBank:CP002884)及第11泳道随机引物S535扩增的247 bp的片段(GenBank:CP002884)与MTB DNA序列有高度的同源性(图1红色箭头所示)分别为99%

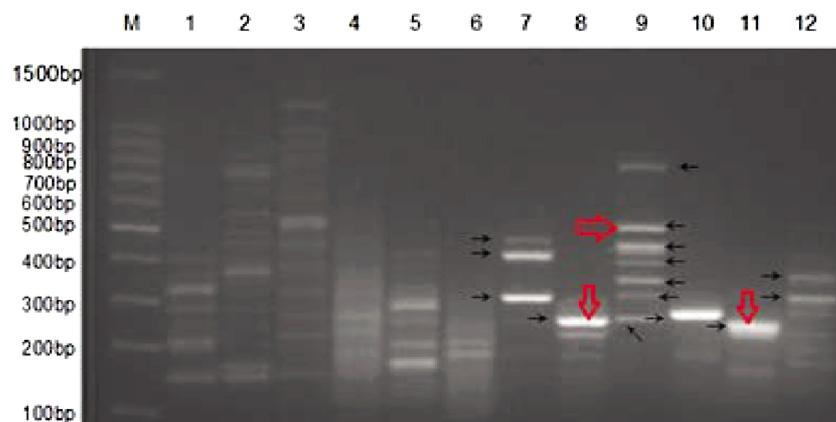


图 1 12 条随机引物对 MTB DNA 的扩增图谱

Fig.1 RAPD profiles of *Mycobacterium tuberculosis*(MTB) using 12 random primers

注:M:100bp DNA Ladder;1.引物 70;2.引物 80;3.引物 90;4.引物 PT1;5.引物 PT2;6.引物 MT;7.引物 MTBC-RP;8.引物 IS986F;9.引物 IS986R;10.引物 INS-2;11.引物 S535;12.引物 ERIC-2。黑箭头所示进行割胶纯化并克隆到载体的条带,红箭头为克隆载体与 MTB 高度匹配的条带。

Note: M:100bp DNA Ladder;1.primer 70;2.primer 80;3.primer 90;4.primer PT1;5.primer PT2;6.primer MT;7.primer MTBC-RP;8.primer IS986F;9.primer IS986R;10.primer INS-2;11.primer S535;12.primer ERIC-2。The bands which black arrow indicate is tapping purified and clone into carrier, the bands which red arrow indicate match with MTB.

(240/241),99%(525/529),99%(218/221);三条带所对应的特异性引物序列及其分别扩增产物片段大小和特征(见表 2)。

2.3 RAPD 联合特异性引物 PCR 扩增 MTB 的敏感性分析

分别用 3 条随机引物对 10 倍梯度稀释的 MTB(1:10-1: 10^5)进行第 1 轮的 RAPD-PCR 扩增(泳道 3,5,7,9,11,13),第 2 轮 PCR 的模板为 10 倍稀释的 RAPD-PCR 产物,用相应的特

异性引物进行 PCR 扩增(泳道 4,6,8,10,12,14),该实验中 ddH₂O 作为空白对照,金葡菌作为阴性对照。可以观察到引物 IS986F 组(图 2)和引物 S535 组(图 3)都能检测出稀释 10⁵ 倍的 MTB DNA,而引物 IS986R 组(图 4)检测下限为稀释 10³ 倍的 MTB DNA。

表 1 第 1 轮 12 种随机引物扩增后 RAPD 结果

Table 1 RAPD profiles of *Mycobacterium tuberculosis*(MTB) using 12 random primers in the first step

Primer name	Primer sequence (5' -3')	No. of bands	Source(reference) and description of the primers
Primer 70	CGGCCACTGT	6	Classical RAPD primer ^[7]
Primer 80	CGGCCCTGT	10	The same as above
Primer 90	CGGCCCCGGT	15	The same as above
Primer PT1	ACGCGCCGTCGGTGG	N	The target sequence of MTP40 ^[17]
Primer PT2	CCCCCACGGCACCGC	6	The same as above
Primer MT	ATTCCCTACCAGCGAGCTGCCG	2	The target sequence of <i>Mycobacterium</i> 32 kD protein gene ^[18]
Primer MTBC-RP	CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	3	The target sequence of 123bp fragment in MTB ^[19]
Primer IS986F	ACGCTCAACGCCAGAGACCA	1	The target sequence of IS6110 ^[20-22]
Primer IS986R	GATGAACCACCTGACATGAC	7	The same as above
Primer INS-2	GCGTAGGCCTCGGTGACAAA	1	The same as above
Primer S535	AGCGTCTTGGCGTCGGTCTTG	1	The target sequence of IS900 ^[23]
Primer ERIC-2	AAGTAAGTGAATGGGGTGAGCG	2	The target sequence of enterobacterial repetitive intergenic consensus ^[24,25]

表 2 第 1 轮 12 种随机引物扩增后 RAPD 结果

Table 2 Specificity of newly prepared PCR primer pairs and amplified band sizes in the second step

Name of specific primers	Sequence of specific primers	PCR product size and description
F-IS986F	TCAGATCAGAGAGTCTCCGGA	182bp
R-IS986F	ACCGCAATGCAATCGAGATT	Is6110 transposase
F-IS986R	CGCTCGCCTTGAACCAGG	451bp
R-IS986R	CTCCGCCTCGATCACCATC	Hypothetical protein
F-S535	GACATTGTTGCCCGATAT	193bp
B-S535	TAGTGTGGTCAGCAGTTGT	PPE family protein

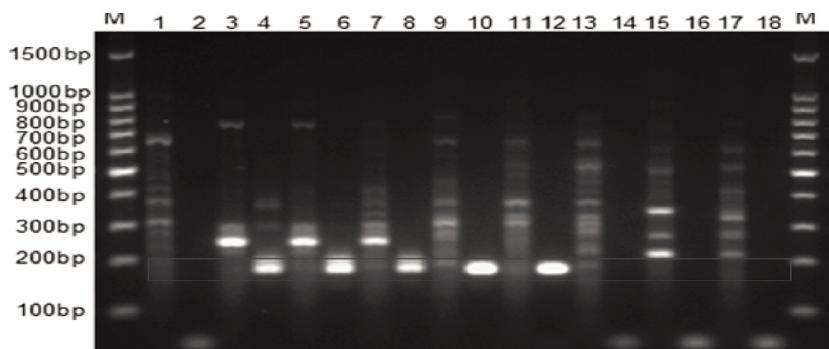


图 2 RAPD 联合特异性引物 PCR 扩增 MTB 的敏感性分析(引物 IS986F)

Fig.2 Sensitivity analysis of amplified MTB RAPD with specific primers PCR (primer IS986F)

注:M:100bp DNA Ladder, 模板分别为(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB DNA 1:10;(5,6)MTB 1:10²;(7,8)MTB 1:10³;(9,10)MTB 1:10⁴;(11,12)MTB 1:10⁵;(13,14)MTB 1:10⁶;(15,16)金葡萄(3ng/μl)按 1:10 稀释;(17,18)金葡萄 1:1000。(奇数泳道为 RAPD 产物, 相邻偶数泳道为特异性引物扩增的产物。)

Note: M; 100bp DNA Ladder, The DNA templates:(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB DNA (1:10 dilution of 3.08 ng/μl);(5,6) MTB 1:10²;(7,8)MTB 1:10³; (9,10)MTB 1:10⁴;(11,12)MTB 1:10⁵;(13,14)MTB 1:10⁶;(15,16)Staphylococcus aureus DNA (1:10 dilution of 3 ng/μl);(17,18)Staphylococcus aureus 1:1000. (Odd lanes represent RAPD products, the adjacent even lanes represent the products of specific primers amplification.)

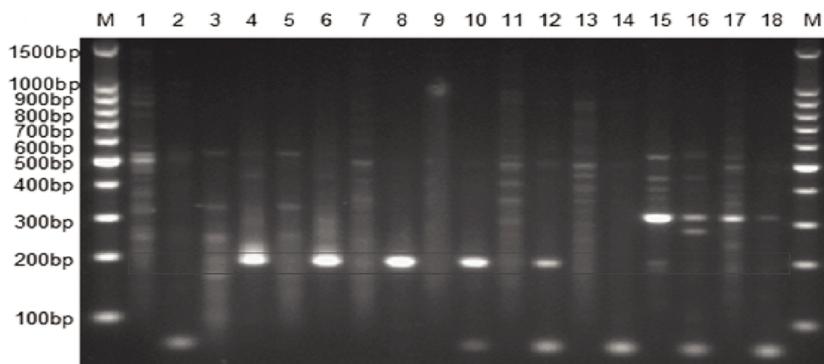


图 3 RAPD 联合特异性引物 PCR 扩增 MTB 的敏感性分析(引物 S535)

Fig.3 Sensitivity analysis of amplified MTB RAPD with specific primers PCR (primer S535)

注:M:100bp DNA Ladder, 模板分别为(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB DNA 1:10;(5,6)MTB 1:10²;(7,8)MTB 1:10³;(9,10)MTB 1:10⁴;(11,12)MTB 1:10⁵;(13,14)MTB 1:10⁶;(15,16)金葡萄 DNA(3 ng/μl)按 1:10 稀释;(17,18)金葡萄 1:1000。(奇数泳道为 RAPD 产物, 相邻偶数泳道为特异性引物扩增的产物。)

Note: M;100bp DNA Ladder, The DNA templates :(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB DNA(1:10 dilution of 3.08 ng/μl);MTB 1:10²;(7,8)MTB 1:10³;(9,10)MTB 1:10⁴;(11,12)MTB 1:10⁵;(13,14)MTB 1:10⁶;(15,16) Staphylococcus aureus DNA(1:10 dilution of 3ng/μl);(17,18) Staphylococcus aureus 1:1000.(Odd lanes represent RAPD products, the adjacent even lanes represent the products of specific primers amplification.)

2.4 RAPD 联合特异性引物 PCR 扩增 MTB 的特异性

通过图 5、图 6、图 7、图 8 可知引物 IS986F 组在所有对照组均无条带扩增, 特异性为 100%, 而引物 S535 组在链球菌(8 泳道), 大肠杆菌(10 泳道), 克雷伯杆菌(12 泳道), 铜绿假单胞菌(14 泳道)都存在一定程度上的扩增, 尤其是链球菌(8 泳道)所扩增的条带位置与 MTB 所扩增的条带位置基本相同, 其特异性为 90.0%。引物 IS986F 组在克雷伯杆菌(12 泳道)与铜绿假单胞菌(14 泳道)的扩增中也存在和 MTB 扩增位置大致相同的条带, 其特异性为 80%。

2.5 市售试剂盒(Real-time PCR)检测 MTB 的敏感性

图 9 从扩增曲线图中可以看出, 样品 1(原始结核杆菌提取的 DNA(3.08ng/μl)按 1:10 稀释), 样品 2(MTB 1:10²), 样品 3(MTB 1:10³), 样品 4(MTB 1:10⁴), 样品 5(MTB 1:10⁵)及样品 6(MTB 1:10⁶)都有扩增, 样品 4,5 之间的一条颜色较淡的咖啡色的线为阳性临界质控品的扩增曲线, 样品 5,6 的扩增曲线位

于阳性临界质控品扩增曲线的右侧, 按照试剂盒判断标准: 若样品扩增曲线位于阳性临界质控品右侧, 判定为样品阴性。因此样品 5,6 为无效扩增。因此试剂盒的可检出稀释 10⁴ 倍的 MTB DNA。

3 讨论

近二十年来随着艾滋病的流行, 流动人口的增加, 结核基因多耐药性的出现, 新药研发投入的减少及卡介苗对成人的无法提供良好的免疫保护作用等因素的影响, 曾经得到控制的结核性疾病再次开始流行。长期以来, 作为结核感染诊断“金标准”的病原学检测因敏感性低等缺点, 一直未能满足临床诊断的需要。尽管近几十年来如: 巢式 PCR, real-time PCR, LAMP(环介导的恒温扩增)及 Xpert MTB/RIF 等新技术的发展、运用, 从很大程度上提高了结核的诊断效率, 尤其是肺部结核。然而, 如今临床小儿结核, 痰涂阴性的结核, 肺外结核以及 HIV

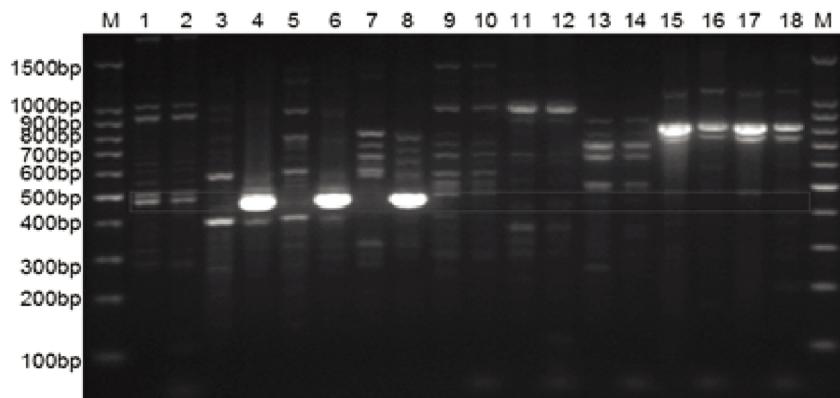


图 4 RAPD 联合特异性引物 PCR 扩增 MTB 的敏感性分析(引物 IS986R)

Fig.4 Sensitivity analysis of amplified MTB RAPD with specific primers PCR (primer IS986R)

注:M:100bp DNA Ladder, 模板分别为(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB DNA 1:10;(5,6)MTB 1:10²;(7,8)MTB 1:10³;(9,10)MTB 1:10⁴;(11,12)MTB 1:10⁵;(13,14)MTB 1:10⁶;(15,16)对照原始金葡菌提取的 DNA(3 ng/μl)按 1:10 稀释;(17,18)金葡菌 1:1000。(奇数泳道为 RAPD 产物, 相邻偶数泳道为特异性引物扩增的产物。)

Note: M;100bp DNA Ladder, The DNA templates :(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB DNA(1:10 dilution of 3.08ng/μl);MTB 1:10²;(7,8)MTB 1:10³;(9,10)MTB 1:10⁴; (11,12)MTB 1:10⁵; (13,14)MTB 1:10⁶; (15,16) *Staphylococcus aureus* DNA(1:10 dilution of 3ng/μl);(17,18) *Staphylococcus aureus* 1:1000 .(Odd lanes represent RAPD products, the adjacent even lanes represent the products of specific primers amplification.)

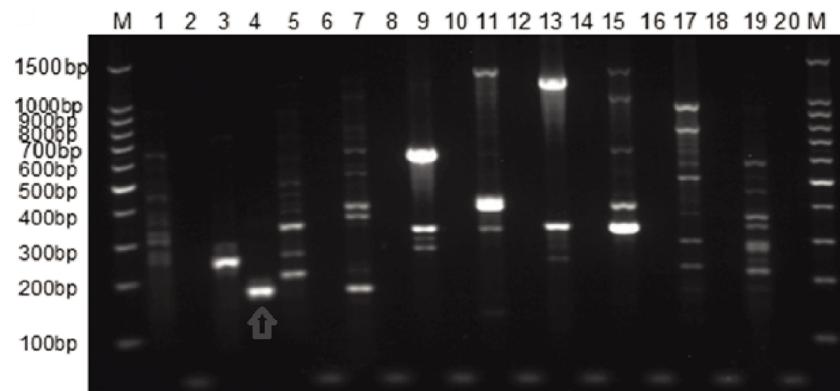


图 5 RAPD 联合特异性引物 PCR 扩增 MTB 的特异性分析(IS986F)

Fig.5 Specificity analysis of amplified MTB RAPD with specific primers PCR (IS986F)

注:M:100bp DNA Ladder, 模板分别为(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB ;(5,6)金葡菌;(7,8)链球菌;(9,10)大肠杆菌;(11,12)克雷伯杆菌;(13,14)铜绿假单胞菌;(15,16)流感嗜血杆菌;(17,18)白色念珠菌;(19,20)新型隐球菌。(奇数泳道为 RAPD 扩增产物, 相邻偶数泳道为特异性引物扩增的产物。)

Note: M;100bp DNA Ladder, The DNA templates: (1,2)ddH₂O;(3,4)MTB; (5,6) *Staphylococcus aureus*; (7,8) *Streptococcus pneumoniae*; (9,10) *Escherichia coli*; (11,12) *Klebsiella pneumoniae*; (13,14) *Pseudomonas aeruginosa*; (15,16) *Haemophilus influenzae*; (17,18) *candida Albicans*; (19,20) *Cryptococcus Neofonmans*(Odd lanes represent RAPD products, the adjacent even lanes represent the products of specific primers amplification.)

共感染的结核逐渐增多,而上述几种方法对这几类结核病诊断的敏感性均不高(34.9%-85.7%)^[9-10],因此迫切需要一种简便、快速、敏感性高、特异性强的新方法解决目前所面临的诊断难题,从而满足结核病的预防、控制及指导临床用药。

本研究拟通过单个随机引物对 MTB DNA 部分的基因组进行放大,再利用一对特异性引物对放大的基因片段进行第 2 次 PCR,从而很大程度地提高了目的基因检测的灵敏性,同时又保证了该方法良好的特异性。基于此分析策略,通过文献查找设计出 12 条用于研究结核分枝杆菌 DNA 多态性的随机引物,并用于 MTB DNA 的第一轮扩增,将扩增产物分别导入克隆载体,并进行 DNA 测序及与 NCBI-nr 数据库进行 Blast 比对,最终筛选出 3 条随机引物:IS986F, S535 及 IS986R。通过图 2, 图 3, 图 4 可以观察到随机引物 IS986F 联合其特异性引物

(引物 IS986F 组) 及引物 S535 组均能检测出稀释 10⁶ 滴度的 MTB DNA,但是引物 IS986R 组的检测下限只有稀释 10³ 的滴度。其原因可能与 MTB 基因组 DNA 对随机引物和特异性引物具有一定的偏好性,又或是与基因组中靶序列拷贝数的多少相关。而图 5,图 6,图 7,图 8 则可以看出引物 IS986F 组的特异性最佳,在所有对照组当中均无扩增条带。引物 S535 组的特异性较差,其中肺炎链球菌,大肠埃希氏杆菌,克雷伯杆菌,铜绿假单胞菌都存在着一定程度上的扩增,尤其是链球菌扩增的条带位置与 MTB 扩增的条带位置大致相同,而引物 IS986R 组的特异性也不佳,因为在克雷伯杆菌,铜绿假单胞菌的扩增中也存在和 MTB 扩增位置大致相同的条带,其原因可能为非特异性的扩增或是与 MTB 有某些相似的 DNA 序列。结合图 9 可知常用临床检测 MTB 试剂盒的检测下限为稀释 10⁴ 倍的

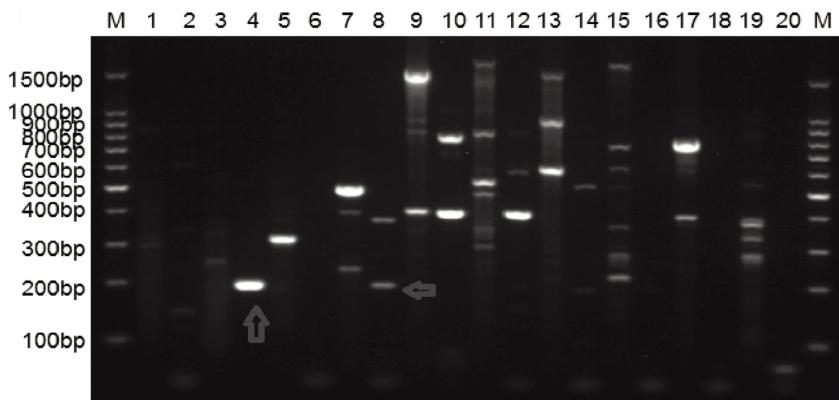


图 6 RAPD 联合特异性引物 PCR 扩增 MTB 的特异性分析(S535)

Fig.6 Specificity analysis of amplified MTB RAPD with specific primers PCR (S535)

注:M:100bp DNA Ladder, 模板分别为(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB;(5,6)金葡萄;(7,8)链球菌;(9,10)大肠杆菌;(11,12)克雷伯杆菌;(13,14)铜绿假单胞菌;(15,16)流感嗜血杆菌;(17,18)白色念珠菌;(19,20)新型隐球菌。(奇数泳道为 RAPD 扩增产物, 相邻偶数泳道为特异性引物扩增的产物。)

Note: M;100bp DNA Ladder, The DNA templates :(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB;(5,6)*Staphylococcus aureus*;(7,8)*Streptococcus pneumoniae*;(9,10)*Escherichia coli*;(11,12)*Klebsiella pneumoniae*;(13,14)*Pseudomonas aeruginosa*;(15,16)*Haemophilus influenzae*;(17,18)*candida Albicans*;(19,20)*Cryptococcus Neofonmans* (Odd lanes represent RAPD products, the adjacent even lanes represent the products of specific primers amplification.)

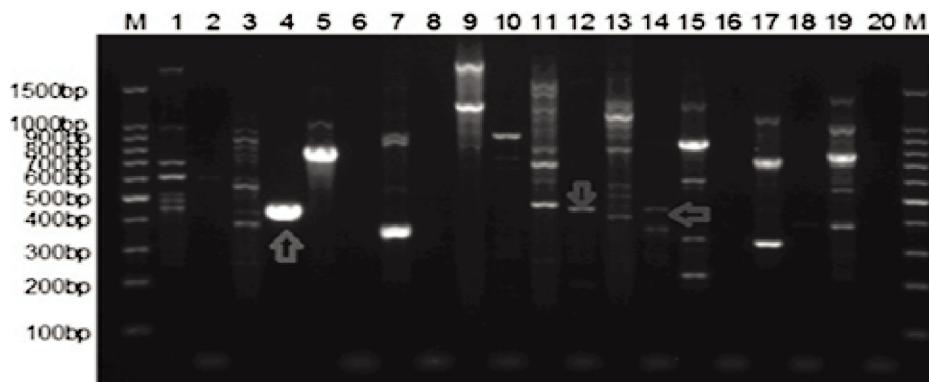


图 7 RAPD 联合特异性引物 PCR 扩增 MTB 的特异性分析(IS986R)

Fig.7 Specificity analysis of amplified MTB RAPD with specific primers PCR (IS986R)

注:M:100bp DNA Ladder, 模板分别为(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB;(5,6)金葡萄;(7,8)链球菌;(9,10)大肠杆菌;(11,12)克雷伯杆菌;(13,14)铜绿假单胞菌;(15,16)流感嗜血杆菌;(17,18)白色念珠菌;(19,20)新型隐球菌。(奇数泳道为 RAPD 扩增产物, 相邻偶数泳道为特异性引物扩增的产物。)

Note: M;100bp DNA Ladder, The DNA templates :(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB;(5,6)*Staphylococcus aureus*;(7,8)*Streptococcus pneumoniae*;(9,10)*Escherichia coli*;(11,12)*Klebsiella pneumoniae*;(13,14)*Pseudomonas aeruginosa*;(15,16)*Haemophilus influenzae*;(17,18)*candida Albicans*;(19,20)*Cryptococcus Neofonmans* (Odd lanes represent RAPD products, the adjacent even lanes represent the products of specific primers amplification.)

MTB DNA 而引物组 IS986F,S535 均能检测到稀释 10⁵ 倍的 MTB DNA, 但是 IS986F 组的特异性更高。因此引物 IS986F 组的特异性高,且灵敏度也高于临床检测 MTB 试剂盒约 10 倍左右。

通过以上实验,可以得知不同的随机引物直接影响到新方法检测的灵敏度和特异度,因此如何选择最佳的随机引物在整个方法的建立显得尤为重要。本实验在权衡特异度及灵敏度的情况下在选取的 12 条随机引物中,最终筛选出最佳的随机引物 IS986F,该随机引物联合其特异性引物可用于检测结核分枝杆菌,与此同时该方法的确立也为其它病原学检测提供了一种新的思路。

全文总结,本文建立了一种随机引物联合多特异性 DNA 片段检测结核分枝杆菌的新方法,初步研究表明该方法比现行临床常规检测 MTB 试剂盒有更高的敏感性,且多种临床常见

细菌及其它分支杆菌对照研究未见假阳性,特异性达 100%,可望为临床提供一种更好的检测手段,进一步满足临床需要。

参 考 文 献(References)

- [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: 485-508
Wang Li-xia, Cheng Shi-ming, Chen Ming-ting, et al. Technical Guidance Group of the Fifth National TB Epi-demiological Survey[J]. The Office of the Fifth National TB Epidemiological Survey. Chinese Journal of Antituberculosis, 2012, 34: 485-508
- [2] Uddin MK, Chowdhury MR, Ahmed S, et al. Comparison of direct versus concentrated smear microscopy in detection of pulmonary tuberculosis[J]. BMC Res Notes, 2013, 6: 291
- [3] 梁亚萍,高漫. BACTECMGIT960 用于结核分枝杆菌快速培养的初步评价[J]. 中国预防医学杂志, 2011, 12: 521-522

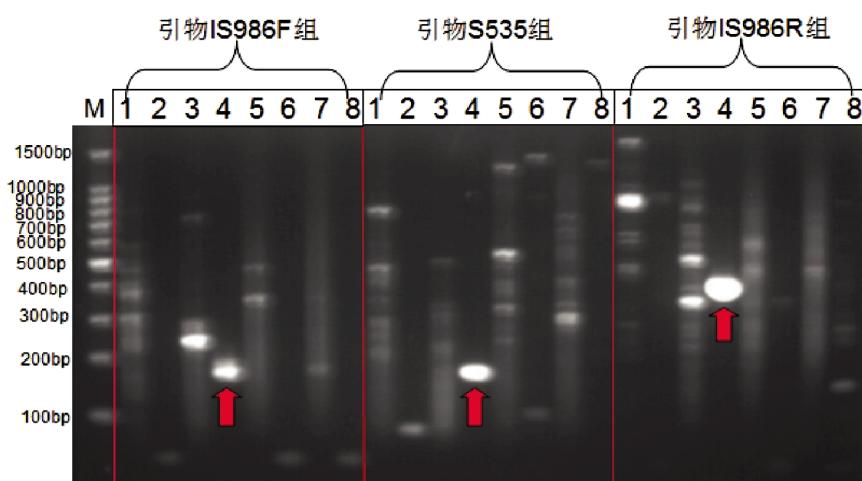


图 8 RAPD 联合特异性引物 PCR 扩增分支杆菌的特异性分析

Fig.8 Specificity analysis of amplified Mycobacterium RAPD with specific primers PCR

注:M:100bp DNA Ladder, 模板分别为(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB;(5,6)麻风分支杆菌;(7,8)鸟分支杆菌(奇数泳道为 RAPD 扩增产物,相邻偶数泳道为特异性扩增产物。)

Note: M;100bp DNA Ladder, The DNA templates :(1,2)ddH₂O;(3,4)MTB;(5,6)Mycobacterium leprae;(7,8)Mycobacterium avium (Odd lanes represent RAPD products, the adjacent even lanes represent the products of specific primers amplification.)

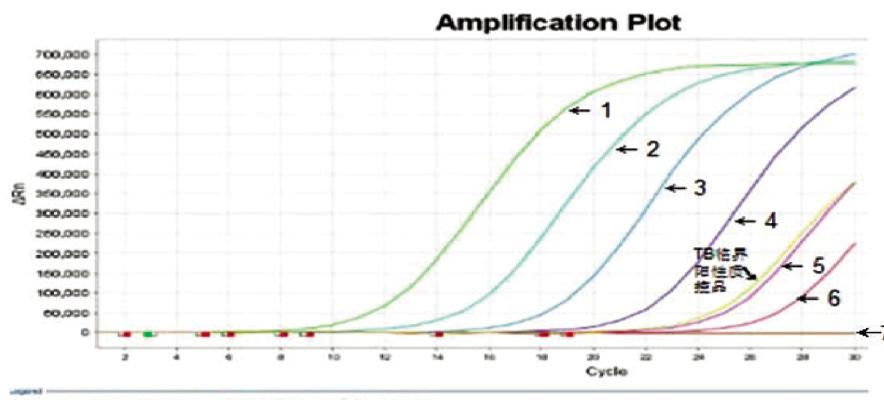


图 9 MTB 检测试剂盒(PCR- 荧光法)对结核标本的扩增曲线图

1.MTB DNA(3.08ng/μL)按 1:10 稀释；2.MTB 1:10²;3.MTB 1:10³;4.MTB 1:10⁴;5.MTB 1:10⁵;6. MTB 1:10⁶ ;7.阴性质控品

Fig.9 Tuberculosis amplification curve with MTB detection kit (RT-PCR method)

1.MTB DNA(1:10 dilution of 3.08ng/μL);2.MTB 1:10²;3.MTB 1:10³; 4.MTB 1:10⁴;5.MTB 1:10⁵;6. MTB 1:10⁶ ;7.Negative control sample

- Liang Ya-ping, Gao Man. Preliminary evaluation of BACTEC MGIT960 on rapid bacterial isolation and drug susceptibility testing for tuberculosis diagnosis[J]. Chinese Preventive Medicine, 2011, 12: 521-522
- [4] Morris K. WHO recommends against inaccurate tuberculosis tests[J]. Lancet, 2011, 377(9760): 113-114
- [5] Stavri H, Bucurenci N, Ulea I, et al. Use of recombinant purified protein derivative (PPD) antigens as specific skin test for tuberculosis [J]. Indian J Med Res , 2012, 136(5): 799-807
- [6] Chegou NN, Heyckendorf J, Walzl G, et al. Beyond the IFN-gamma horizon: Biomarkers for immunodiagnosis of infection with M. tuberculosis[J]. Eur Respir J, 2014, 43(5): 1472-1486
- [7] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535
- [8] Welsh J and McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24): 7213-7218
- [9] Wang X, Wu Y, Zhang K, et al. Value of real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of pediatric pulmonary tuberculosis[J]. Braz J Infect Dis, 2013, 17(6): 718-719
- [10] Chang K, Lu W, Wang J , et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis[J]. J Infect, 2012, 64(6): 580-588
- [11] Wang JY, Lee LN, Chou CS, et al. Performance assessment of a nested-PCR assay (the RAPID BAP-MTB) and the BD ProbeTec ET system for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(10): 4599-4603
- [12] Lee MR, Chung KP, Wang HC, et al. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB real-time PCR assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens [J]. J Med Microbiol, 2013, 62(Pt 8): 1160-1164
- [13] Mitarai S, Okumura M, Toyota E, et al. Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2011, 15(9): 1211-1217

- [14] Haldar S, Sharma N, Gupta VK, et al. Efficient diagnosis of tuberculous meningitis by detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in cerebrospinal fluid filtrates using PCR [J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(Pt 5): 616-624
- [15] Gao Y, Ou Q, Huang F, et al. Improved diagnostic power by combined interferon-gamma release assay and nested-PCR in tuberculous pleurisy in high tuberculosis prevalence area [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 66(3): 393-398
- [16] Kibiki GS, Mulder B, van der Ven AJ, et al. Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for *M. tuberculosis* in bronchoalveolar lavage fluid[J]. *Trop Med Int Health*, 2007, 12(10): 1210-1217
- [17] Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis[J]. *J Clin Microbiol*, 1991, 29(10): 2163-2168
- [18] 孟祥红, 匡铁吉, 董梅. 应用多重 PCR 方法快速鉴定结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌[J]. *解放军医学杂志*, 2007, 32: 1177-1178
Meng Xiang-hong, Kuang Tie-ji, Dong Mei. Application of multiplex PCR in rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculosis *Mycobacteria* [J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2007, 32: 1177-1178
- [19] Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobac-*
- terium tuberculosis[J]. *J Infect Dis*, 1990, 161(5): 977-981
- [20] Linton CJ, Smart AD, Leeming JP, et al. Comparison of random amplified polymorphic DNA with restriction fragment length polymorphism as epidemiological typing methods for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Clin Mol Pathol*, 1995, 48(3): 133-135
- [21] Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, et al. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis [J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(9): 2051-2058
- [22] Hashemi A, shojaei H, Heidarieh P, et al. Genetic diversity of Iranian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *New Microbiol*, 2012, 35(1): 61-65
- [23] Englund S, Ballaqi-Pordá ny A, Bölske G, et al. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999, 33(3): 163-171
- [24] Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterbacteria [J]. *Mol Microbiol*, 1991, 5(4): 825-834
- [25] Sechi LA, Zanetti S, Dupré I, et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(1): 128-132

(上接第 5800 页)

- [38] Bernier P J, Bedard A, Vinet J, et al. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(17): 11464-11469
- [39] Xiong K, Luo D W, Patrylo P R, et al. Doublecortin-expressing cells are present in layer II across the adult guinea pig cerebral cortex: partial colocalization with mature interneuron markers [J]. *Exp Neurol*, 2008, 211(1): 271-282
- [40] Guo F, Maeda Y, Ma J, et al. Pyramidal neurons are generated from oligodendroglial progenitor cells in adult piriform cortex [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(36): 12036-12049
- [41] Schoenfeld T J, Gould E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis[J]. *Exp Neurol*, 2012, 233(1): 12-21
- [42] Wentz C T, Magavi S S. Caffeine alters proliferation of neuronal precursors in the adult hippocampus[J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56(6-7): 994-1000
- [43] Ohira K, Furuta T, Hioki H, et al. Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(2): 173-179
- [44] Sirko S, Neitz A, Mittmann T, et al. Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex[J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 8): 2252-2264
- [45] Zhang X M, Cai Y, Chu Y, et al. Doublecortin-expressing cells persist in the associative cerebral cortex and amygdala in aged nonhuman primates[J]. *Front Neuroanat*, 2009, 3: 17