

# 利用 *rpoB* 基因芯片技术进行快速分枝杆菌菌种鉴定

李洪敏\* 樊博 王巍 李国利 苗青

(解放军总医院第二临床部结核病研究所 北京 100091)

**摘要:** 利用 *rpoB* 基因芯片技术快速进行分枝杆菌菌种鉴定。以分枝杆菌 *rpoB* 基因编码序列为靶基因, 用基因芯片技术检测 21 种分枝杆菌标准株; 8 种其它细菌标准株; 126 株临床分离株。分枝杆菌与其它细菌标准株经 PCR 扩增后, 分枝杆菌标准株均扩增出 360 bp DNA 片段, 在其它细菌中, 除甲型溶血性链球菌和假白喉棒状杆菌出现同样片段外, 其它细菌均未见扩增。21 种寡核苷酸探针除海分枝杆菌与偶然分枝杆菌的探针有交叉杂交外, 其余均为特异性杂交。对 126 株临床分离株进行鉴定, 89 株为结核分枝杆菌, 占 70.6% (89/126), 非结核分枝杆菌 (NTM) 占 9.2% (9/98)。应用 *rpoB* 基因芯片技术鉴定分枝杆菌菌种, 是一种快速、准确的方法, 具有较高的临床应用价值。

**关键词:** 分枝杆菌, *rpoB* 基因芯片, 寡核苷酸探针, 核酸杂交

## Rapid Species Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by *rpoB* Gene Micro Array

LI Hong-Min\* FAN Bo WANG Wei LI Guo-Li MIAO Qing

(Tuberculosis Research Institute, The 2nd Clinical Department of PLA General Hospital, Beijing 100091)

**Abstract:** Rapid species identification of *Mycobacterium tuberculosis* by *rpoB* gene micro array. Based on the gene micro array of *rpoB*, the standard strains of 21 mycobacteria and 8 non-mycobacteria, 126 clinical isolated of mycobacteria were detected by PCR-reverse dot blot hybridization assay. 360bp DNA fragment was amplified from all mycobacteria tested and was not found in all nonmycobacteria except *Hemolytic streptococcus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. The result of specimens were detected by the probe which is composed of 21 oligonucleotide was that probe-*Mycobacterium fortuitum* cross hybridized with *Mycobacterium platyepiscus* while the other probes were specific. The 89 strains of the all 126 strains isolated from clinical specimens were identified to be mycobacterium tuberculosis, the percentage was 70.6% (89/126), while the other 9 strains were identified to be unmycobacterium tuberculosis and the the percentage was 9.2% (9/98). Identification of Mycobacteria by *rpoB* gene micro array is a rapid and effective method which is of considerable value in clinical territory.

**Keywords:** Mycobacterium, *rpoB* gene micro array, Oligonucleotide probe, Nucleic acid hybridization

当前, 非结核分枝杆菌病(NTM)急剧增多, 且广泛传播扩散, 成为严重威胁人民健康的重要问题。长期以来采用的传统菌种鉴定试验繁琐费时, 已远远不能满足临床诊断需要。因此, 进行快速分枝杆菌菌种鉴定有其重要的价值。分枝杆菌 *rpoB* 基因(依赖 DNA 的 RNA 聚合酶  $\beta$  亚单位)具有种属信息保守区和包含种属特异性信息的可变区, 国外已有对其序列进行分析的研究, 报道 *rpoB* 基因有应用为靶基因来鉴定分枝杆菌菌种的价值。本文利用 *rpoB* 基因芯片技术, 对我国的 126 株临床标本进行快速分枝杆菌菌种鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标准菌株及标本来源:** 标本来源: 实验用 126 株临床分离株来源于本院结核科。实验用 21 种分枝杆菌标准株、8 种其他细菌标准株(大肠埃希氏菌、肺炎克雷伯菌、绿脓假单胞菌、金黄色葡萄球

菌、表皮葡萄球菌、甲型溶血性链球菌、肺炎链球菌、假白喉棒状杆菌)来源于中国药品生物制品检定所。

**1.1.2 分枝杆菌 *rpoB* 基因引物及寡核苷酸探针:** 设计引物及 21 种分枝杆菌寡核苷酸探针。各分枝杆菌菌种及对应的探针为: 分枝杆菌属(pMyc)、结核分枝杆菌复合体(pTub)、鸟分枝杆菌(pAvi)、胞内分枝杆菌(pInt)、堪萨斯分枝杆菌(pKan)、脓肿分枝杆菌(pAbs)、瘰癧分枝杆菌(pScr)、胃分枝杆菌(pGas)、偶然分枝杆菌(pFor)、龟分枝杆菌(pChe)、海分枝杆菌(pMar)、猿猴分枝杆菌(pSim)戈登分枝杆菌(pGor)、苏加分枝杆菌(pSzu)、玛尔塔分枝杆菌(pMal)、蟾蜍分枝杆菌(pXen)、微黄分枝杆菌(pFla)、土地分枝杆菌(pTer)、耻垢分枝杆菌(pSme)、不产色分枝杆菌(pNon)、草分枝杆菌(pPhl)。引物 I(5'端生物素标记)和引物 II 之间包括了 360 bp 片段。设计引物及 21 种分枝杆菌寡核苷酸探针均由上海生工生物工程有限公司合成。引物及探针序列见表 1。

表 1 引物及探针序列  
Table 1 The sequences of primers and probes

引物 探针 Primer probe	靶细菌 Target bacterium	序列 5'→3' Sequences 5'→3'
Primer I (5'marked by biotin)	分枝杆菌属	TCAAGGAGAAGCGCTACGA
Primer II	分枝杆菌属	GGATGTTGATCAGGGTCTGC
pMyc	分枝杆菌属	TCGATGGTGGCGACGACGTC
pTub	结核分枝杆菌复合体	GGGCTCGCCGACATG
pAvi	鸟分枝杆菌	GGTGATCGGCTCACCG
pInt	胞内分枝杆菌	TCGCCCCGCTGCAGG
pKan	堪萨斯分枝杆菌	CACGGTCATCGTGGCC
pAbs	脓肿分枝杆菌	GGTGGTGGTGGTCACC
pScr	瘰癧分枝杆菌	GCTGGCCATCCGTACG
pGas	胃分枝杆菌	CCTGGCCACCCTGAGA
pFor	偶然分枝杆菌	CTGGCCGGCGTTTCAGG
pChe	龟分枝杆菌	CGTGGTGGCAGTCACCA
pMar	海分枝杆菌	GGTGATGGGCTGGCC
pSim	猿猴分枝杆菌	CGTCATCGTCGGCTGG
pGor	戈登分枝杆菌	TGATCGGATCGCCGAC
pSzu	苏加分枝杆菌	CTCGCCGACGTTTCAGA
pMal	玛尔塔分枝杆菌	GTACGGCCGACTCGGC
pXen	蟾蜍分枝杆菌	TTGGCGCATTCTCGGTG
pFla	微黄分枝杆菌	CGGGTTCTCGGTGATG
pTer	土地分枝杆菌	TCGGCGACGTCTCGAC
pSme	耻垢分枝杆菌	TCGGCTTGCCCGCGTT
pNon	不产色分枝杆菌	CATGGTGGTGGACACG
pPhl	草分枝杆菌	GCCGATCGGCTGACC

## 1.2 方法

**1.2.1 探针加尾:** 50  $\mu\text{L}$  反应体系内 5X 末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)反应缓冲液 10  $\mu\text{L}$ , dTTP 终浓度 2mmol/L, TdT 80 U, 加无菌水至 50  $\mu\text{L}$ , 混合后稍离心, 置 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h, 加入 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 2  $\mu\text{L}$  中止反应。

**1.2.2 DNA 提取及 PCR 扩增:** 参照文献[10]提取标准株、临床分离株 DNA。在 25  $\mu\text{L}$  反应体系内进行 PCR 扩增, 10 $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ , 引物 I、II 终浓度均为 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , Taq DNA 聚合酶 1U, DNA 模板 10ng~20 ng, 加无菌水至 25  $\mu\text{L}$ 。置 PCR 仪内 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  1 min、58 $^{\circ}\text{C}$  1 min、72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延长 8 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

**1.2.3 反向斑点杂交:** (1) 制膜: 取加尾的探针 2 pmol 按顺序点于尼龙膜上(PALL 公司产), 置 60 $^{\circ}\text{C}$  干烤固定 2h。固定后的膜经漂洗 II 液去除未固定的探针, 可以立即使用, 也可以待干燥后保存于 4 $^{\circ}\text{C}$  待用。(2) 杂交: 点有加尾探针的膜放入反应袋中, 在各反应袋中分别加入杂交液(5 $\times$  SSC, 1%blocking 试剂, 0.1%十二烷基肌氨酸钠, 0.02%SDS) 5 mL。然后将 15  $\mu\text{L}$ ~20  $\mu\text{L}$  的 PCR 产物置 PCR 仪 95 $^{\circ}\text{C}$  加热变性 8 min, 然后立即冰浴 8 min。在反应袋中加入变性的 PCR 产物, 混匀, 封袋, 54 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。(3) 洗膜: 洗液 I (2 $\times$  SSC, 0.1%SDS) 室温洗膜 2 次, 洗液 II (0.1 $\times$  SSC, 0.1%SDS) 55 $^{\circ}\text{C}$  洗膜 10 min。(4) 酶结合物与标记引物结合: 将碱性磷酸酶标记的链亲和素按 1: 10000 的比例加入缓冲液 III (100 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.5%blocking 试剂, pH7.5) 中, 与杂交后的膜室温下作用 30 min。(5) 洗膜: 缓冲液 I (100 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5) 室温洗膜 2 次, 每次 10 min, 缓冲液 II (100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , pH 9.5) 室温洗膜 5min。(6) 显色: 用 BCIP-NBT 系统显色, 待 30 min DNA 显色, 用  $\text{H}_2\text{O}$  液洗膜终止显色反应。

## 2 结果

### 2.1 rpoB 基因引物 PCR 的扩增分析

引物 I 和引物 II 扩增的所有分枝杆菌标准株、临床分离株均扩增成功, 8 种其它细菌中只有甲型溶血性链球菌和假白喉棒状杆菌标准株出现扩增。

### 2.2 rpoB 基因芯片探针的特异性

分枝杆菌标准株经扩增后的反向斑点杂交中, 属探针 pMyc 和所有分枝杆菌标准株均杂交; 尼龙膜探

针分布从左至右, 从上到下顺序依次为探针 pMyc、pTub、pAvi、pInt、pKan、pAbs、pScr、pGas、pFor、pChe、pMal、pSim、pGor、pSzu、pMal、pXen、pFla、pTer、pSme、pNon、pPhl。上述探针只和相应菌种杂交, 探针 pFor 与海分枝杆菌标准株扩增产物发生交叉杂交, 但探针 pMar 与偶然分枝杆菌扩增产物无杂交, 因此并不影响对鉴定结果的判读。杂交结果见图 1-4。8 种其它细菌中的甲型溶血性链球菌和假白喉棒状杆菌标准株与 pMyc 分枝杆菌探针无杂交。



图 1 1-6 株分枝杆菌标准株结果

Fig. 1 Results of mycobacteria type strains 1 to 6

顺序依次为分枝杆菌、结核分枝杆菌、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、脓肿分枝杆菌

From left to right: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium marianum* (pMyc, pTub, pAvi, pInt, pKan, pAbs)

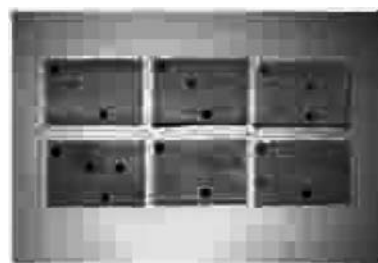


图 2 7-12 株分枝杆菌标准株结果

Fig. 2 Results of mycobacteria type strains 7 to 12

从左至右依次为瘰癧分枝杆菌、胃分枝杆菌, 偶然分枝杆菌, 龟分枝杆菌, 海分枝杆菌, 猿猴分枝杆菌

From left to right: *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium platypocillus*, *Mycobacterium simian*, *Mycobacterium gordonae* (pScr, pGas, pFor, pChe, pMar, pSim)

### 2.3 临床分离株的检测

126 株临床分离株中, 与 pMyc 分枝杆菌探针杂交有 98 株, 其余 28 株为其他细菌感染; 与 pTub 结核分枝杆菌复合群探针杂交有 89 株, 鉴定为结核分枝杆菌, 占 70.6% (89/126), 有 9 株为 NTM 感染, 占 9.2% (9/98), 进一步用芯片鉴定为: 脓肿分枝杆菌 4 株, 胞内分枝

杆菌 2 株, 偶然分枝杆菌 1 株, 2 株只与 pMyc 属探针杂交鉴定为分枝杆菌属。



图 3 13–18 株分枝杆菌标准株结果

Fig. 3 Results of mycobacteria type strains 13 to 18

从左至右依次为戈登分枝杆菌, 苏加分枝杆菌, 玛尔摩分枝杆菌, 蟾蜍分枝杆菌, 微黄分枝杆菌, 土地分枝杆菌, 耻垢分枝杆菌。

From left to right: *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium malmoeense*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium smegmatis* (pGor, pSzu, pMal, pXen, pFla, pTer)

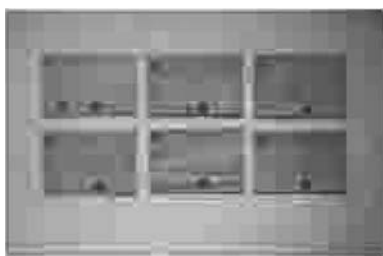


图 4 19–24 株分枝杆菌标准株和临床株结果

Fig. 4 Results of mycobacteria type and clinical strains 19 to 24

从左至右依次为不产色分枝杆菌, 耻垢分枝杆菌, 土地分枝杆菌, 草分枝杆菌, 22–24 为临床分枝杆菌株。

From left to right: *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium phlei* and from 22–24 are clinical strains (pSme, pNon, pPhl)

### 3 讨论

近年来, 非结核分枝杆菌病的发病率呈上升的趋势。其临床表现: X 线特征和抗酸染色结果与结核病极其相似, 很难鉴别。原用的非结核分枝杆菌生化反应方法繁琐, 历时 2 个月, 影响诊断与治疗。应用分子生物学技术针对分枝杆菌进行快速鉴定, 建立准确、快速的鉴定方法就显得十分重要。分枝杆菌基因芯片鉴定技术提高了菌种鉴定的敏感性、准确性。目前国内外针对 16S rRNA 基因以及 16S rDNA-23S rDNA ITS 鉴定分枝杆菌菌种均有较深入的研究<sup>[1, 2, 3]</sup>, Andreas Roth 等通过对 16S rRNA-23S rRNA 基因转录间隔区的测序分析, 鉴定了堪萨斯分枝杆菌与胃分枝杆菌、海分枝杆菌与溃疡分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌与苏加分枝杆菌等通过 16S rRNA 基因难以鉴定的菌种<sup>[4]</sup>。*hsp65* 基因也有部分研究开展<sup>[5]</sup>。我们选定比较有研究价值的 *rpoB* 基因芯片技术鉴定分枝杆菌菌种。

分枝杆菌的 *rpoB* 基因为分枝杆菌依赖 DNA 的 RNA 聚合酶 $\beta$ 亚单位的编码基因, 分枝杆菌 *rpo* 是由  $\alpha$   $\beta$   $\beta'$   $\sigma$  四个亚单位形成的四聚体, 其核心酶是  $\alpha$   $\beta$   $\beta'$  的聚合体, 全酶为  $\alpha$   $\beta$   $\beta'$   $\sigma$  聚合体。核心酶  $\alpha$   $\beta$   $\beta'$  就可完成 RNA 聚合酶的功能, 但是需要  $\sigma$  亚单位在转录启动区确定转录起始位置, 编码  $\alpha$   $\beta$   $\beta'$   $\sigma$  亚单位的基因就被分别称为 *rpoA*、*rpoB*、*rpoC*、*rpoD* 基因<sup>[6]</sup>。Hyeyoung Lee 等<sup>[7, 8]</sup>报道通过测序 *rpoB* 可变区 1 和保守区 2 之间的序列分析, 预示此序列有可能鉴定 44 种分枝杆菌菌种。我们所扩增的 *rpoB* 基因 360 bp 片段两端为保守序列, 中间有两个序列高变区, 不同分枝杆菌之间变异较大, 可以设计探针来鉴别分枝杆菌, 我们共设计 21 个探针, 可以鉴定 20 种分枝杆菌至种。

所试分枝杆菌标准株及临床株均出现 360 bp 扩增片段, 在其它细菌标本中, 甲型溶血性链球菌和假白喉棒状杆菌出现同样 360 bp 片段, 但此扩增片段与探针杂交过程中是阴性的。所设计探针中有堪萨斯分枝杆菌和胃分枝杆菌的探针, 能将 16S rRNA 基因无法鉴别的这两种菌种鉴别开来, 也有苏加分枝杆菌和玛尔摩分枝杆菌的探针, 龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌的探针, 这些都是 16S rRNA 基因序列相似而鉴别困难的菌种, 在实验中我们均可应用 *rpoB* 基因芯片顺利鉴别开来。这与 Bum – Joon Kim<sup>[9]</sup>及 Hyeyoung Lee<sup>[7, 8]</sup>等的报道结果相符合。

126 株临床分离株经 *rpoB* 基因芯片鉴定为 89 结核分枝杆菌, 占 70.6%。有 9 株为 NTM 感染, 占 9.2%(9/98), 与 7 年前报道结果相近<sup>[10]</sup>。本实验进一步鉴定出 9 株是 NTM 感染, 其中最常见的是脓肿分枝杆菌感染, 占 44.4%(4/9)。脓肿分枝杆菌生存力强, 易于扩散, 对许多抗结核药物均不敏感, 临床治疗较为困难, 非结核分枝杆菌病(NTM)的广泛传播的原因之一, 可能与此菌感染有关。临床应用 *rpoB* 基因芯片技术不仅操作简便, 亦可鉴定到种, 用经培养后的临床分离株进行实验, 3 天即可发出报告。由于将多种分枝杆菌特异性的寡核苷酸探针固定于膜上, 与液相中的待检标本杂交的特点, 尤其适用于临床多量标本检测的需要, 省时, 准确, 成本相对降低, 有较为广泛的临床应用价值。

### 参考文献

- [1] Roth A, Fischer M, Hamid ME. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol*. 1998, 36(1): 139–147.
- [2] Roth A, Reischl U, Streubel A. Novel diagnostic algorithm

- for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**(3): 1094-104.
- [3] 李国利, 庄玉辉, 赵 铭, 等. 聚合酶链反应-反向斑点杂交鉴定分枝杆菌菌种. 中华检验医学杂志, 2000, **23**(4): 241-243.
- [4] Andreas Roth, Marga Fischer, Mohamed E Hamid. Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria Based on 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**(2): 139-147.
- [5] Alan McNabb, Diane Eisler, Kathy Adie. Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene (*hsp65*) for Routine Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Clinical Sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, **42**(7): 3000-3011.
- [6] Lincoln P Miller, Jack T Crawford, Thomas M Shinnick. The *rpoB* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, **38**(4): 805-811.
- [7] Hyeyoung Lee, Hee-Jung Park, Sang-Nae Cho. Species Identification of *Mycobacteria* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of the *rpoB* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, **38**(8): 2966-2971.
- [8] Hyeyoung Lee, Hye-Eun Bang, Gill-Han Bai. Novel Polymorphic Region of the *rpoB* Gene Containing *Mycobacterium* Species-Specific Sequences and Its Use in Identification of *Mycobacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, **41**(5): 2213-2218.
- [9] BumJoon Kim, SeungHyun Lee, Mi - Ae Lyu. Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol*, 1999, **37**(6): 1714-1720.
- [10] 李洪敏, 吴雪琼, 张俊仙, 等. 应用 PCR-SSCP 方法快速鉴别结核分枝杆菌复合群. 微生物学通报, 2000, **27**(3): 202.

## 编辑部公告

### 中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立,已取得北京市工商局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务,此四种期刊均为中国自然科学核心期刊,国内外公开发行,主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态,已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录,是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息,也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则,愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作,共同发展。如有刊登广告的需要,欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息!也可以登陆各刊网站,了解更多详情。

提示:从 2007 年起,各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下新账号:

收款单位:中国科学院微生物研究所

开户银行:中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐号:0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话:010-64807336; 010-64807521

联系人:武文 王 闵

电子信箱:gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>