

建立液相芯片方法检测鉴别结核分枝杆菌复合群、 鸟分枝杆菌与副结核分枝杆菌

陈茹^{1*} 毕英佐² 刘志玲¹ 周仲芳¹ 刘志辉³ 陈芳¹ 赵吟¹

(1. 广东出入境检验检疫局 广东 广州 510623)

(2. 华南农业大学 广东 广州 510642)

(3. 广州市胸科医院 广东 广州 510095)

摘要: 运用液相芯片技术原理, 以分枝杆菌菌种(群)特异基因序列 IS6110、IS1081、IS1245 和 F57 为目标基因, 设计筛选 4 套扩增引物和杂交探针, 建立同时检测鉴别结核分枝杆菌复合群、鸟分枝杆菌和副结核分枝杆菌的四重液相基因芯片检测方法。对 13 种共 54 株分枝杆菌菌株以及 23 种常见微生物样品的检测结果显示, 四重液相芯片方法可特异检测鉴别目标菌种(群), 与其它分枝杆菌菌种或微生物无非特异交叉反应; 检测敏感性达 2.1×10^1 – 2.5×10^2 基因拷贝或 0.06–0.74 fg DNA; 组内检测变异系数和组间检测变异系数均 <10%。采用四重液相芯片方法从临床结核疑似人痰样和牛组织样品中检出结核致病菌, 检出率分别达 75.6% (99/131) 和 94.9% (37/39), 显著高于培养法 (38.9% 和 53.8%)。对副结核疑似临床样品的检测试验结果显示, 四重液相芯片方法与荧光 PCR 方法的阳性符合率为 83% (24/29)。对四重混合模板的检测试验结果显示该液相芯片方法可鉴别不同菌种混合感染。四重液相芯片方法的检测周期 <1 d, 其中对纯化 DNA 模板的检测时间可在 2–3 h 内完成。

关键词: 液相芯片技术, 结核分枝杆菌复合群, 鸟分枝杆菌, 副结核分枝杆菌

Development of a liquidchip assay for simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *M. avium* and *M. paratuberculosis*

CHEN Ru^{1*} BI Ying-Zuo² LIU Zhi-Ling¹ ZHOU Zhong-Fang¹ LIU Zhi-Hui³
CHEN Fang¹ ZHAO Yin¹

(1. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

(2. South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

(3. Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou, Guangdong 510095, China)

基金项目: 广东出入境检验检疫局科研项目(No. 2007GDK06)

*通讯作者: Tel: 86-20-38290911; Fax: 86-20-38290422; ✉ chenr@iqtc.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

收稿日期: 2010-10-08; 接受日期: 2010-12-14

Abstract: A microsphere-based LiquidChip assay was developed for rapid and simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Four sets of oligonucleotide primers and probes which respectively targeted at IS6110, IS1081, IS1245 and F57 specific genes of mycobacterium were selected to establish the quadruplex assay. The quadruplex assay specifically identified target strains from a total of 54 strains of 13 species of mycobacterium, and 23 species of non-mycobacterium microorganisms were all detected as negative. The sensitivity on detecting cloned plasmid DNA by the quadruplex assay was $2.1 \times 10^1 - 2.5 \times 10^2$ genomic copies or 0.06–0.74 fg DNA per reaction. The intra-assay and inter-assay variations of the quadruplex assays were both lower than 10%. The assay detected 75.6% (99/131) and 94.9% (37/39) positive from TB suspected human sputum samples and bovine tissue samples respectively, compared to culture methods that detected 38.9% and 53.8% positive from human and bovine samples respectively. The quadruplex assays also detected 24 MAP positive from 29 bovine blood specimens detected as positive by real time PCR specific for MAP. The tests on quadruplex mixed templates showed that the assay could identify mix infections. Clinical detection by the assay could be finished within one day, and the detection on purified DNA template could be completed in 2–3 h.

Keywords: LiquidChip technique, *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. a.* subsp. *paratuberculosis*

结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC)是引起人与哺乳动物结核病(Tuberculosis, TB)的一类致病性分枝杆菌的总称,包括结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tuberculosis*, MT)、牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*, *M. bovis*, MB)、非洲分枝杆菌(*M. africanum*)和田鼠分枝杆菌(*M. microti*)等菌种。其中,主要感染人与家畜并致病的是 MT 和 MB。除 MTC 外,自然界还存在多种致病性非结核分枝杆菌(NTM),鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*, MA)和副结核分枝杆菌(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, MAP)是其中对人畜感染普遍、危害突出的致病菌种。MAP 引起动物副结核病(Paratuberculosis), MA 感染禽类引起禽结核、感染猪等家畜引起呼吸道和消化道病症^[1-2],同时 MA 也是医学界重点关注的感染病菌,引起非典型肺炎、艾滋病并发感染、皮肤感染等病症^[3-5]。除对人畜健康造成直接危害,鸟分枝杆菌和副结核分枝杆菌的感染还干扰结核病的诊断,造成结核假阳性,影响结核病防控、根除以及进出口动物检疫。

快速准确的病原菌检测鉴定技术是有效防控人畜结核、副结核以及鸟分枝杆菌感染的重要技术支撑,由于 NTM 对抗结核药物耐药,准确鉴别 MTC 与致病性 NTM 在治疗方面还具有重要意义。分枝

杆菌生长缓慢,菌种之间同源性高,形态结构以及生化特性相近,采用细菌分离培养、镜检以及皮内变态反应等传统诊断技术具有周期长、敏感性低、难于准确鉴定菌种以及假阳性率高等弊端。20 世纪 90 年代以来,国内外陆续开展以分枝杆菌基因组特异核酸序列检测为基础的检测技术研究,建立了聚合酶链式反应(PCR)、荧光 PCR、PCR-RFLP 以及固相基因芯片等多种方法,在检测速度、敏感性、准确性等方面均超越传统检测方法。

液相芯片(Liquidchip)技术又称微球悬浮芯片(Microsphere-based suspension array)技术,是在流式细胞技术和芯片技术基础上开发的新一代高通量分子诊断技术平台,能实现多目标高通量快速检测^[6-7],近年在国际临床高通量检测技术领域备受关注。液相芯片技术的核心是乳胶微球包被和荧光色编码以及液相分子杂交。该技术以直径为 5.6 μm 的聚苯乙烯乳胶微球作为基质,每种微球带有独特的荧光色编码,可分别偶联不同的核酸或蛋白探针,与待检物分子通过碱基配对原理(核酸检测)或抗原-抗体、配体-受体反应原理(蛋白检测)进行液相杂交反应从而达到检测目的。本文报道应用液相基因芯片技术原理建立新型检测方法,实现同时检测鉴别 MTC、MA 和 MAP 等多种致病性分枝杆菌。

1 材料与方 法

1.1 菌种与核酸材料

灭活结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、鸟分枝杆菌以及草分枝杆菌(*M. phlei*)等其它 9 种分枝杆菌样品,均源自美国标准菌种保藏中心(ATCC)标准菌株,MAP 标准菌株购自中国兽医与药品监督所(CVCC)。卡介苗(BCG)冻干粉为兰州生物制品研究所产品(冻干皮内注射用卡介苗,批号 20000912)。MT 分离株(15 株)核酸样品由广州市胸科医院提供;MB 分离株(7 株)核酸样品由华中农业大学馈赠;MAP 分离株(8 株)灭活样品由吉林农业大学馈赠,MA 分离株(3 株)核酸样品由广东出入境检验检疫局技术中心保存。

鼠伤寒沙门氏菌(CMCC 50115)、奇异变形杆菌(CMCC 49003)、威尔氏李斯特菌(ATCCF 35897)、格式李斯特菌(ATCC 25401)、表皮葡萄球菌(CMCC 26906)、产气肠杆菌(CMCC 45103)、宋内氏志贺氏菌(CMCC 51334)、乙型溶血链球菌(CMCC 32210)、绿脓杆菌(CMCC AS1.0212)、大肠埃希氏菌(ATCC 25922)、肠致病性大肠埃希氏菌(ATCC 43887)、产肠毒素大肠埃希氏菌(ATCC 35401)、肠侵袭性大肠埃希氏菌(ATCC 43893)、普通变形杆菌(CMCC AS1.1527)、金黄色葡萄球菌(CMCC 26003)、副溶血性弧菌(ATCC 17802)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(ATCC 9610)、空肠弯曲菌(ATCC 33560)、溶藻弧菌(ATCC 17749)、阪崎肠杆菌(ATCC 29544)、大肠杆菌 0157:H7 (ATCC 12900)、珊瑚链霉菌(ATCC 23901)、砖红链霉菌(ATCC 19776)等 23 种微生物核酸样品均源自 ATCC 或中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC)的标准菌株。

1.2 临床试验材料

肺炎门诊人群痰样采自广州市胸科医院;结核疑似牛临床样品(肺、淋巴结、血样)采自新疆地区(由华中农业大学提供)。呈副结核荧光 PCR 检测阳性的牛血样由广东出入境检验检疫局技术中心检测保存。健康牛淋巴结样品由广州市奶牛研究所提供,健康牛肺样品采自农贸市场。猴基因组 DNA 样品用绿猴肾传代细胞提取基因组 DNA 制备,牛、羊、鸡、猪等动物全基因组 DNA 从各物种的肌肉组织中提取。

1.3 主要试剂与设备

高保真 *Taq* 酶(Promega 产品),MES [2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, 2-(N-吗啡基)乙磺酸, Sigma 产品], 5 mol/L TMAC (Tetramethylammonium chloride, 氯化四甲基胺, Sigma 产品), EDC [1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, 1-乙基-(3-二甲基-丙烷)氢氯化二酰亚胺, Pierce 产品], SAPE (亲和素枣红蛋白, Invitrogen 产品); 羧基化微球(Carboxylated microspheres, Uminex 产品)。

液相芯片检测仪(LiquidChip 200 Reader, 购自德国 QIAGEN 公司), PCR 扩增仪(ABI 2700, 购自美国应用生物系统公司)。

1.4 核酸提取方法

从痰样、组织、血样等临床样品中提取分枝杆菌核酸的方法按文献[8-9]进行。

1.5 阳性克隆质粒制备

通过常规 PCR 分别扩增含 IS6110、IS1081、IS1245 和 F57 菌种特异目标基因序列的核酸片段,按常规基因克隆操作将扩增产物克隆到 pMD19-T 质粒载体中。转化大肠杆菌后获得的重组质粒均进行测序验证。

1.6 液相芯片扩增引物、探针设计与合成

采用 Array Designer 4.0 software 软件设计扩增引物及杂交探针。MTC 特异的引物与探针以多拷贝插入基因序列 IS6110、IS1081 为模板设计,选定的引物与探针序列参见文献[8]报道。MAP 特异的扩增引物与探针以 F57 结构基因为模板设计,上游引物序列 5'-GCACAGACGACCATTCAAG-3', 下游引物序列 5'-CTCAGACAGTGGCAGGTG-3', 探针序列 5'-GGCTCGGTGACAACAACATTC-3'。MA 特异的扩增引物与探针以 IS1245 特异插入序列为模板设计,上游引物序列 5'-CCGAAACGATCTACCAAGC-3', 下游引物序列 5'-AATCCGCAGTTCCAGGTC-3', 探针序列 5'-GCGTTCATCGGGGCTTCT-3'。所设计的寡核苷酸引物与探针均委托美国 IDT 公司合成、标记,选择 HPLC 纯化。探针 5'端标记氨基,下游引物 5'端标记生物素。

1.7 寡核苷酸探针与微球偶联

按反应用量取出少量微球原液分装到微量离

心管中, 15 000×g 离心 10 min, 弃上清, 依次加入 50 μL 0.1 mol/L MES (pH 4.5)、1–3 nmol 氨基标记探针和 10 μL 新鲜配制的 EDC 溶液(10 mg/L), 振荡混匀, 室温避光反应 30 min。用 0.02% Tween-20 溶液和 0.1% SDS 溶液依次洗涤偶联微球, 振荡混匀, 15 000×g 离心 10 min, 弃上清; 加 50–100 μL 1×TE (pH 8.0)缓冲液重悬偶联微球。偶联好的微球可置 4 °C 存 6 个月以上。

1.8 液相基因芯片扩增反应体系与扩增反应条件

采用 50–100 μL 反应体积进行不对称扩增(标记引物与非标记引物用量比为 5:1), 每个反应含 *Taq* 酶 1–2 Unit, dNTP 每种各 0.2 mmol/L, 2.0 mmol/L MgCl₂, 上游非标记引物每条 0.2 μmol/L, 生物素标记下游引物每条 1 μmol/L, DNA 模板 5 μL, 加无核酸酶超纯水补足体积至 50 μL。扩增循环反应条件如下: 94 °C 2 min; 94 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 1 min。

1.9 液相杂交与检测分析

用 1.5×TMAC 将偶联微球稀释成工作液, 使每 33 μL 微球工作液中含各编码微球 1 000 个。把微球工作液分装到 PCR 管中, 33 μL/管。在每个样品孔中加入 5–10 μL PCR 产物, 加 1×TE (pH 8.0)至总体积为 17 μL; 在空白对照孔中加入 17 μL 1×TE (pH 8.0); 用吸嘴充分混匀, 把各反应管放入 PCR 仪, 按以下条件进行液相芯片杂交反应: 95 °C 5 min; 52 °C 15–20 min。杂交反应结束后, 离心弃上清。同时, 用 1×TMAC 将 SAPE 稀释至 5 mg/L (1×TMAC-SAPE 报告液), 在每管微球沉淀中, 加入 80 μL 1×TMAC-SAPE 报告液, 充分混匀, 置 PCR 仪 52 °C 温育 5 min; 取 75 μL 液体, 用液相芯片检测仪(设置载板温度为 52 °C)进行检测, 检测结果以 MFI (Median fluorescence intensity)荧光值表示。

1.10 重复性试验方法

组间(Intra-assay)重复性检测试验: 对 MT、MB、MAP 或 MA 标准菌株的基因组 DNA 分别进行 5 管平行的四重液相基因芯片检测(包括四重扩增和四重微球杂交检测)试验, 并计算各目标基因 MFI 检测值的差异(组间变异系数, Inter-assay CV, %)。组内重复性检测试验: 对上述阳性分枝杆菌基因组 DNA

模板的同一管扩增产物做 5 次平行的四重液相杂交和检测试验, 记录各目标基因对应的 MFI 检测值, 并计算 5 次平行试验所得检测值的差异(组内变异系数, Intra-assay CV, %)。

1.11 细菌分离培养

人痰样与结核疑似动物临床样品中分枝杆菌的分离培养采用改良罗氏培养法, 具体操作按医院标准规程进行。

1.12 比对试验方法

结核疑似临床样品的检测及与培养法的比对: 采用本研究建立的液相芯片检测方法, 从医院肺炎门诊人群采集 131 份痰液样品, 从结核发病牛群采集 39 份结核疑似牛临床样品并采集 20 份健康牛组织样品, 采用本研究建立的四重液相芯片法和细菌分离培养法分别进行检测并比较检测结果。副结核疑似临床样品的检测及与 PCR 方法的比对: 取呈副结核荧光 PCR (本课题组建立方法, 试剂盒批号 PB090716)检测阳性的临床牛血样 29 份, 采用本研究建立的四重液相芯片法进行检测并统计检出率。

2 结果

2.1 液相基因芯片特异性试验

采用上述四重液相基因芯片检测方法, 对 13 种共 54 株分枝杆菌标准菌株或分离株样品、以及 23 种各种常见微生物样品和各种动物基因组 DNA 样品进行检测试验, 记录各样品的荧光检测值(MFI 值), 并计算样品 MFI 值与 MFI 本底值的比值 *LQRR* (Luminex qualitative ratio result)。本底值计算方法: 取阴性模板进行检测, 测 10 次 MFI 值, 取平均值设为本底值。判定阈值设为 $MFI=100$ 且 $LQRR=5$ 。样品检测值 \geq 判定阈值的判为阳性, 否则判为阴性。

检测试验显示, 上述四重液相基因芯片检测方法对分枝杆菌标准株与分离株、以及各种对照菌株样品等的检测结果与理论推导相符: MT、MB、MA 以及 MAP 等目标菌种均呈典型阳性反应, 不同菌种的分枝杆菌之间无交叉反应, 对 23 种各种微生物样品和各种动物基因组 DNA 样品均呈阴性反应。表 1 显示对分枝杆菌菌株样品的特异性检测试验结果。

表 1 多重液相芯片特异性检测试验结果
Table 1 Specificity tests on *Mycobacterium* strains by the microsphere-based multiplex assay

菌株 Strain	数据 Data	目标基因检测值(MFI & LQRR) Reaction signals for target genes (MFI & LQRR)			
		IS6110	IS1081	IS1245	F57
结核分枝杆菌 <i>M. tuberculosis</i>	MFI	802	1 247	13	21
ATCC 27294	LQRR	59.6	40.4	1.0	0.99
结核分枝杆菌 <i>M. tuberculosis</i>	MFI	561→1 015	624→1 366	15→67	15→46
分离株(n=15) Isolate strain	LQRR	41.7→75.5	46.4→44.2	0.91→2.16	0.72→2.2
牛分枝杆菌 <i>M. bovis</i>	MFI	764	997	15.5	3
ATCC 27291	LQRR	56.8	32.3	1.16	0.14
牛分枝杆菌 <i>M. bovis</i>	MFI	653	964	5	11
(BCG 疫苗)	LQRR	48.6	31.2	0.37	0.50
牛分枝杆菌 <i>M. bovis</i>	MFI	619→963	795→1 320	9.5→43	3→51
分离株(n=7) Isolate strain	LQRR	46.0→71.6	25.8→42.8	0.71→3.2	0.14→2.45
鸟分枝杆菌 <i>M. avium</i>	MFI	62	39	1 362	93
ATCC 15769	LQRR	4.6	1.3	102	4.5
鸟分枝杆菌 <i>M. avium</i>	MFI	63	73	1 667	51
ATCC 25291	LQRR	4.7	2.4	125	2.4
鸟分枝杆菌 <i>M. avium</i>	MFI	22→59	25→66	1 243→1 476	37→77
分离株(n=3) Isolate strain	LQRR	1.6→4.4	0.8→2.1	93→110	1.8→3.7
副结核分枝杆菌 <i>M. a. subsp. paratuberculosis</i>	MFI	27	55	28	3 775
CVCC 68605	LQRR	2.0	1.8	2.1	181
副结核分枝杆菌 <i>M. a. subsp. paratuberculosis</i>	MFI	46	31	17	3 584
CVCC 68623	LQRR	3.4	1.0	1.3	172
副结核分枝杆菌 <i>M. a. subsp. paratuberculosis</i>	MFI	39	33	18	3 505
CVCC 68627	LQRR	2.9	1.1	1.3	168
副结核分枝杆菌 <i>M. a. subsp. paratuberculosis</i>	MFI	53	18	25	3 640
CVCC 68635	LQRR	3.9	0.6	1.9	175
副结核分枝杆菌 <i>M. a. subsp. paratuberculosis</i>	MFI	27	32	16	3 852
CVCC 68636	LQRR	2.0	1.0	1.2	185
副结核分枝杆菌 <i>M. a. subsp. paratuberculosis</i>	MFI	29	27	17	4 089
CVCC 68601	LQRR	2.1	0.9	1.3	196
副结核分枝杆菌 <i>M. a. subsp. paratuberculosis</i>	MFI	63	22	21	3458
CVCC 68637	LQRR	4.7	0.7	0.8	166
副结核分枝杆菌 <i>M. a. subsp. paratuberculosis</i>	MFI	17→47	17→59	10→108	202→4 294
分离株(n=8) Isolate strain	LQRR	0.5→3.5	0.5→1.8	0.7→4.2	9.7→206
其它分枝杆菌(9种) Other mycobacterium	MFI	17→68	34→68	18→50	27→69
	LQRR	1.3→4.0	1.0→2.1	1.3→3.3	1.3→3.2
本底值 Background value	MFI	13	31	13	21
Blank					

注: 表中黑色加粗的数字表示阳性反应.*其它分枝杆菌: 龟分枝杆菌(ATCC 14472)、草分枝杆菌(ATCC 11758)、堪萨斯分枝杆菌(ATCC 12478)、胞内分枝杆菌(ATCC 13950)、耻垢分枝杆菌(ATCC 19420)、胃分枝杆菌(ATCC 15754)、偶发分枝杆菌(ATCC 6481)、蟾分枝杆菌(ATCC 19970).

Note: Numbers in bold face indicate a positive value as described in the main text.*Other mycobacterium: *M. chelonae* (ATCC 14472), *M. phlei* (ATCC 11758), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. intracellulare* (ATCC 13950), *M. smegmatis* (ATCC 19420), *M. gastri* (ATCC 15754), *M. scrofulaceum* (ATCC 19981), *M. fortuitum* (ATCC 6481), *M. xenopi* (ATCC 19970).

2.2 液相基因芯片敏感性试验

取分别克隆了 IS6110、IS1081、IS1245 以及 F57 目标基因序列的克隆质粒 DNA, 用分光光度计按常规测吸光度值并换算为核酸浓度, 将样品进行 10 倍系列稀释后进行检测试验, 每个稀释度均做 2 次重复试验。根据计算公式: 质粒拷贝数/ μL =[总含量(g/L)]/(质粒分子碱基数 $\times 10^{-15}$ μg), 推算检测终点对应的 DNA 模板基因拷贝数和 DNA 模板用量。检测结果显示, 四重液相芯片方法对上述 4 种目标基因克隆 DNA 模板的检测敏感性达每个反应 2.1×10^1 – 2.5×10^2 基因拷贝, 对应 DNA 模板用量达每个反应 0.06–0.74 fg。

2.3 液相芯片重复性试验

采用 MT、MB、MAP 或 MA 标准菌株的基因组 DNA 做为检测模板, 按 1.10 进行组内和组间重复性试验。检测结果显示, 各目标基因检测值的组内变异系数 $<5\%$, 组间变异系数 $<10\%$, 详见表 2。

2.4 多重混合模板检测试验

将 MT、MB、MAP 和 MA 标准菌株基因组

DNA 等量混合后进行液相芯片检测试验。结果显示, 在 4 种模板同时存在的情况下, 四重液相基因芯片检测方法对 4 种目标基因的检测均呈典型阳性反应, 详见表 3。

表 3 液相芯片检测方法对四重混合模板的检测试验结果
Table 3 Detection on mixed templates by the quadruplex LiquidChip assay

检测值 Data	检测结果 Detection result			
	IS6110	IS1081	IS1245	F57
<i>MFI</i>	1 054	1 694	849	1 697
<i>LQRR</i>	78	44	17	35

2.5 临床检测及比对试验

2.5.1 结核疑似临床样品的检测及与培养法的比对: 对从医院肺炎门诊采集的 131 份人群痰液样品的检测结果显示, 采用液相芯片法检出 90 份 MTC 阳性(均呈 IS6110、IS1081 目标基因检测阳性)、检出 9 份 MA 阳性, F57 目标基因的检测结果呈阴性。采用培养法从 131 份样品中检出 51 份阳性。51 份培养阳性的样品均呈液相芯片检测阳性(其中 48 份呈 IS6110、IS1081 基因检测阳性, 3 份呈 IS1245 检测阳性)。对 39 份结核疑似牛组织样品(淋巴结 10 份、肺组织 29 份)的检测结果显示, 采用液相芯片法检出 37 份 MTC 阳性(呈 IS6110 和 IS1081 目标基因检测阳性), IS1245 和 F57 基因均呈检测阴性。39 份样品中有 21 份样品呈培养阳性, 培养阳性的样品均呈液相芯片检测阳性(均呈 IS6110、IS1081 基因检测阳性)。详见表 4。采用上述液相芯片法对 20 份健康牛组织样品(淋巴结、肺组织各 10 份)的检测结果均呈阴性。

表 2 多重液相芯片检测方法重复性试验
Table 2 Reproducibility tests of the multiplex LiquidChip assay

菌株 Strains	检测变异系数 Deviation of detection CV (%)					
	MT	MB	MA	MAP		
目标基因 Target gene	IS6110	IS1081	IS6110	IS1081	IS1245	F57
组内变异系数 Intra-assay CV (%)	3.6	2.7	2.7	2.1	3.3	5.0
组间变异系数 Inter-assay CV (%)	4.6	6.5	9.0	7.3	4.2	4.7

表 4 液相芯片法对结核疑似临床样品的检测及与培养法的比对
Table 4 Comparative tests with culture on detection of TB suspected clinical samples

样品 Samples	检测数量 Number tested	检测结果 Results	液相芯片法 LiquidChip assay					培养法 Culture
			IS6110	IS1081	IS1245	F57	总体	
痰样 Sputum	131	阳性数量 Positive number	90	90	9	0	99	51
		阳性率 Positive rate (%)	68.7	68.7	6.9	–	75.6	38.9
组织 Tissue	39	阳性数量 Positive number	37	37	0	0	37	21
		阳性率 Positive rate (%)	94.9	94.9	–	–	94.9	53.8

2.5.2 副结核疑似临床样品的检测及与 PCR 方法的比对: 采用液相芯片法从 29 份副结核疑似牛血样中检出 24 份样品呈 MAP 阳性(F57 目标基因检测阳性), 其余目标基因均呈检测阴性。液相芯片法与荧光 PCR 法的阳性符合率为 83% (24/29)。采用 F57 特异常规 PCR 方法^[10]对上述 24 份呈液相芯片法检出阳性的样品进行检测试验, 结果检出 11 份呈 PCR 阳性。

3 讨论

本研究在国内外首次建立了同时检测鉴别结核分枝杆菌复合群、鸟分枝杆菌和副结核分枝杆菌的多重液相芯片高通量检测方法, 可应用于快速检测人畜禽结核病原菌、进行动物结核与副结核快速鉴别诊断等工作。

液相基因芯片技术整合了多重核酸扩增、微球液相杂交以及激光检测等技术原理, 具有快速、高通量、灵敏、特异的优点, 其杂交反应和后续检测不需繁琐的洗涤步骤, 核酸扩增与杂交均为闭管操作, 操作比固相芯片技术更为简便、检测速度更快、更有效避免交叉污染, 确保检测反应特异高效。由于采用液相悬浮杂交原理, 反应动力学比固相芯片技术更为灵活、高效。与常规多重核酸扩增技术相比, 由于液相芯片技术对扩增产物的检测采用液相杂交和激光信号检测的原理, 能显著提高检测敏感性, 有效避免常规多重核酸扩增导致敏感性下降的不足。

建立液相基因芯片检测方法, 关键在于设计筛选适合多重检测的扩增引物和杂交探针。本研究针对不同致病性分枝杆菌菌种之间基因组同源性高, 在其它菌种分枝杆菌中也有与目标基因同源性较高的序列, 并且液相芯片技术对寡核苷酸的碱基组成、长度等参数有具体要求, 因此, 建立适合多种重要致病性分枝杆菌检测鉴别的液相基因芯片检测方法难度较高。本研究一方面通过生物信息学分析手段从理论分析的角度初步筛选多重方案, 一方面通过大量的检测试验以及反应条件的优化, 逐一选定适合多重液相基因芯片检测的 4 套引

物和探针组合。

在目标基因的选择方面, 本研究针对 MTC 采用了 IS6110 和 IS1081 两个靶基因, 两者都是 MTC 特有的插入序列, 其中, 大多数 MT 分离株含高拷贝数 IS6110^[11], 而大多数 MB 分离株含低拷贝甚至 1 个拷贝 IS6110^[12], 已发现个别 MT 分离株中不含 IS6110^[13]; 而 IS1081 在 MB 分离株中拷贝数较高^[11]。因此, 同时采用 2 种目标基因建立检测方法, 更有利于确保 MTC 的检测敏感性, 提高检出率。IS1245 是 MA 特有的插入序列^[14], 虽然分类上 MAP 属 MA 的一个亚种, 但 MAP 的基因组不含 IS1245。F57 是 MAP 特有的结构基因^[15]。选择上述 4 种特征基因作为多重液相芯片体系的目标基因可实现检测鉴别的目的。

通过对 13 种共 54 株分枝杆菌标准菌株和分离株、23 种各种常见微生物样品以及各种动物基因组 DNA 的检测试验, 证实所建立的液相基因芯片检测方法具有高度的特异性, 能特异检测鉴别 MTC 致病菌种以及 MA 和 MAP 致病菌。对四重混合模板的检测试验证实, 所建立的液相基因芯片方法能同时分辨多种目标基因, 表明可用于检测鉴别不同菌种同时(混合)感染的情况。该法检测灵敏度可达每个反应 10^1 - 10^2 基因拷贝或低于 1 fg DNA, 表明检测敏感性高。重复性试验结果显示, 该法对各目标基因的组内检测变异系数和组间检测变异系数均小于 10%, 表明检测性能稳定。

在临床检测方面, 采用四重液相基因芯片检测方法从门诊人群痰液样品和结核疑似牛组织样品中均检出 MTC 阳性, 检出率均显著高于培养法, 其中培养法阳性的样品均呈液相芯片检测阳性。培养法需 4-8 周, 而液相芯片检测方法(包括样品处理)仅需 1 d, 其中对纯化 DNA 模板的检测时间可在 2-3 h 内完成, 比对试验显示, 与传统的培养法相比较, 液相基因芯片方法具有快速、高效并能准确鉴定菌种的优势。在上述结核疑似人痰液样品中还检出 MA 阳性, 表明结核疑似患者中存在非结核分枝杆菌感染, 这与国内外医学界的监测报道一致。对副结核疑似样品的比对检测试验显示, 四重液相芯片

方法的检出率显著高于常规 PCR 方法、但低于单重荧光 PCR 方法。本课题组进行的其它比对试验也显示, 单重荧光 PCR 方法的检测敏感性优于多重液相芯片方法(资料未显示)。虽然敏感性不及单重荧光 PCR 方法, 但多重液相芯片方法具有同时检测鉴别多个目标基因的优势, 在临床检测和研究领域中具有独特的实用价值。

综上所述, 本研究运用液相芯片技术原理, 针对重要致病性分枝杆菌建立了新型分子生物学检测鉴别方法, 为结核、副结核等分枝杆菌病的诊断提供了新型的病原菌快速检测技术手段, 对人畜疫病防控、进出口检验检疫以及分枝杆菌病研究等工作均具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Pavlik I, Dvorska L, Matlova L, et al. Mycobacterial infections in cattle in the Czech Republic during 1990–1999[J]. *Vet Med-Czech*, 2002, 47(9): 241–250.
- [2] Mijs W, de Haas P, Rossau R, et al. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and ‘*M. avium* subsp. *hominissuis*’ for the human/porcine type of *M. avium*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52(5): 1505–1518.
- [3] Matlova L, Dvorska L, Ayele WY, et al. Distribution of *Mycobacteriu avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(3): 1261–1268.
- [4] Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria[J]. *Clin Chem*, 2001, 47(5): 809–814.
- [5] 王洪生, 吴勤学. 非结核分枝杆菌感染与艾滋病[J]. 国外医学: 皮肤性病学分册, 2005, 31(3): 166–168.
- [6] Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexd nucleic acid detection[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 363(1/2): 71–82.
- [7] Kellar KL, Iannone MA. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays[J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(11): 1227–1237.
- [8] Chen R, Bi YZ, Yang GH, et al. Development of a fluorescent microsphere-based multiplex assay for simultaneous rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis* in clinical samples[J]. *Diagn Mol Pathol*, 2010, 19(3): 172–179.
- [9] 陈茹, 刘中勇, 高小博, 等. 副结核荧光 PCR 试剂盒研制与应用[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2): 292–297.
- [10] Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, et al. Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(8): 3048–3054.
- [11] van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, et al. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis[J]. *J Clin Microbiol*, 1991, 29(11): 2578–2586.
- [12] Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, et al. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110[J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(5): 1143–1147.
- [13] Yuen LKW, Ross BC, Jackson KM, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization[J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(6): 1615–1618.
- [14] Guerrero C, Bernasconi C, Burki T, et al. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness[J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(2): 304–307.
- [15] Ellingson JL, Bolin CA, Stabel JR. Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis[J]. *Mol Cell Probes*, 1998, 12(3): 133–142.