

结核杆菌耐药基因膜芯片检测*

韦世录¹, 何敏¹, 何晓², 蒙江明³, 王祖恩³, 银春莲³, 张志勇², 仇小强²

摘要: 目的 建立一种快速检测结核杆菌对异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、喏诺酮类耐药基因的方法。方法 应用 Oligo 6.0 设计 12 对引物、54 条探针 构建多重聚合酶链式反应 (multiplex polymerase chain reaction, 多重 PCR) 结合反向斑点杂交膜芯片检测结核耐药基因的方法, 并对 52 株结核杆菌临床分离株进行检测。结果 12 对引物分 4 个反应管建立了同一条件下 PCR 反应体系, 54 条探针组成的膜芯片中包含 36 条野生型检测探针、16 条突变型检测探针、阳性和阴性对照探针各 1 条; 利用膜芯片检测结核杆菌耐药性的灵敏度为 95.4% (41/43), 特异度为 100%, 与药敏试验耐药种类的完全一致率为 53.5% (23/43)。结论 多重 PCR 联合膜芯片技术能有效地检测结核杆菌耐药基因, 并有助于结核杆菌耐药性判断, 具有灵敏度高、特异性好、简便、快速等优点, 适合于基层应用。

关键词: 结核杆菌; 多重 PCR; 膜芯片

中图分类号: R 378.91⁺¹

文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2012)04-0425-03

Membrane chip for detection of drug resistance gene of *Mycobacterium tuberculosis* WEI Shi-lu, HE Min, HE Xiao, et al. *Scientific Laboratory Centre, Guangxi Medical University (Nanning 530021, China)*

Abstract: Objective To develop a rapid method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) drug-resistant genes of isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol, pyrazinamide and quinolones. **Methods** We designed 12 pairs primers and 54 probes by Oligo 6.0, constructed a gene membrane chip for MTB drug-resistant gene detection by the combination of multiplex PCR and reverse dot blot hybridization, and detected 52 clinical isolates of MTB. **Results** The 12 primers were divided into 4 reactions to establish a multiplex PCR reaction system under the same conditions. Then with reverse dot blot hybridization, a gene membrane chip of 54 oligonucleotide probes was developed and the chip included 36 wild-type probes, 16 mutant probes, and a positive and a negative probe. The sensitivity of the MTB drug-resistant gene detection with the chip was 95.4% (41/43) and the specificity was 100%. **Conclusion** The gene membrane chip developed with the combination of multiplex PCR and reverse dot blot hybridization could be used to detect MTB drug-resistant gene effectively, and the method is rapid and convenient and with good sensitivity and specificity for grassroot application.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; multiplex PCR; gene membrane chip

反向点杂交膜芯片, 其原理是将特异性探针先固定在固相载体膜上, 在液体环境中与单链 PCR 产物的靶序列特异结合, 再经过酶显色而完成检测。在前期研究中本课题组曾采用商品化的结核杆菌耐药基因膜片检测试剂盒检测结核杆菌耐药性, 但杂交结果与药敏结果比较后, 发现试剂盒在检测耐药种类方面与药敏结果有较大差异⁽¹⁻²⁾。因此, 本研究根据结核杆菌标准株 H37Rv 全基因组序列中的 katG、inhA、ahpC promoter、rpoB、rpsL、rrs、embB、pncA、gyrA 等 9 个耐药基因序列, 应用 Oligo 6.0 软件重新设计 12 对下游引物 5' 端标记生物的特异性引物、54 条寡核苷酸探针, 重新构建结核耐药基因检测的反向斑点杂交膜芯片, 以进一步提高结核杆菌多耐药基因膜芯片检测的灵敏度和特异度。

1 材料与方法

1.1 材料 52 株结核杆菌临床分离株样本来自南宁市第四人民医院。主要试剂有 PCR 试剂 (Taq 酶、10 × Buffer, 三磷酸脱氧核苷 dNTP, 日本 TaKaRa 公司); 尼龙膜 (带正电荷, 15 × 20 cm, 0.45 μm, 美国 PALL 公司); 四甲基联苯胺 (TMB)、POD 母液 (深圳亚能生物技术有限公司)。主要仪器有 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 凝胶成像分析系统 (美国 BIO-RAD 公

司); 杂交炉 (美国 Thermo 公司)。

1.2 培养分离菌株标本处理及 DNA 提取 参见文献 [2]。

1.3 引物设计与合成 根据结核杆菌标准株 H37Rv 的 katG、inhA、ahpC promoter、rpoB、rpsL、rrs、embB、pncA、gyrA 基因序列, 应用 Oligo 6.0 软件分别设计 12 对特异性寡核苷酸引物, 以上引物均由上海生工生物工程公司合成并纯化, 12 条下游引物 5' 端生物素标记。引物序列已申请专利 200910114023.4。

1.4 单基因 PCR 的优化 单基因 PCR 反应体系: 模板 DNA 1 μL, 上、下游引物各 0.5 μL (10 pmol/μL), 2.5 mmol/L dNTP 1 μL, Taq 酶 0.2 μL (5 U/μL), 10 × Buffer 2.5 μL, 其余用去离子水补足, 总体积 25 μL。程序: 95 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 50 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 50 s, 共进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。对影响 PCR 反应的条件如退火温度、引物浓度等进一步优化, 将退火温度梯度设置为 45.8、50.5、54、61.4、66 °C, 其他反应条件同上, 确定最佳退火温度; 引物以 10 pmol/μL, 在反应体系中分别加入 0.3、0.5、0.8、1.0、2 μL, 退火温度以上确定的为准, 其他反应条件不变, 确定最佳引物浓度。

1.5 多重 PCR 优化

1.5.1 多重 PCR 扩增 12 对引物分为 4 个反应管, 每管有 3 对引物, 多重 PCR 反应体系: 模板 DNA 4 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1 μL, Taq 酶 0.5 μL (5 U/μL), 10 × Buffer 6 μL, 上、下游引物 (10 pmol/μL) 加入量以单基因 PCR 最佳引物浓度为准, 其余用去离子水补足, 总体积 50 μL。程序同上。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳。

* 基金项目: 广西科技厅资助项目 (桂科基 0991011; 桂科攻 033004-11; 桂科攻 0235024-27); 广西高校百名中青年学科带头人资助计划

作者单位: 1. 广西医科大学医学科学实验中心, 广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学公共卫生学院; 3. 南宁市第四人民医院
作者简介: 韦世录 (1980-) 男, 壮族, 广西来宾人, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 分子流行病学。

通讯作者: 何敏: E-mail: m_h_m868@sina.com

1.5.2 多重 PCR 优化 设置退火温度为 50、56、58、60、62 °C 其他反应条件同 1.5.1, 确定最佳退火温度。每对引物先以单基因 PCR 确定的最佳引物浓度为准加入, 再根据产物量大小来平衡引物的加入量, 产物量较多的引物, 降低该引物的终浓度; 反之, 产物量较少的引物则增大其终浓度。

1.6 电泳 各种实验条件优化过程中, 获得 PCR 产物时均进行琼脂糖凝胶电泳。取 PCR 产物 5 μ L, 点样于溴化乙锭染色的 2.0% 琼脂糖凝胶上, 120 V 电压, 电泳 35 min。

1.7 DNA 序列测定 多重 PCR 扩增结核杆菌敏感株 DNA, 取 5 μ L 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并切胶纯化进行 DNA 序列测定, 将测定结果与美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) Genbank 数据库进行同源序列比对 (basic local alignment search tool, BLAST), 判断测序结果与目的序列是否具有高度同源性。

1.8 膜芯片探针设计与合成 针对结核杆菌常见的耐药突变位点, 用 Oligo 6.0 设计 36 条野生型检测探针、16 条突变型检测探针, 设计阴性对照探针, 取 *katG* 基因下游引物 P2 作为阳性对照探针。探针由上海生工生物工程公司合成并纯化。探针序列已申请专利 200910114023.4。

1.9 膜芯片制备 尼龙膜裁剪为 6.5 cm \times 2 cm, 取 0.8 μ L 探针点于同一张尼龙膜上, 室温晾干后 80 °C 烘烤 1 ~ 2 h 后备用。

1.10 膜芯片杂交与结果判读 室温下用 A 液 (2 \times SSC, 0.1% SDS, pH 7.4) 清洗膜片 30 s。55 °C 杂交炉预杂交 15 ~ 30 min。将保持单链状态的变性产物加入预热的 A 液中, 55 °C 杂交 4 h。同时预热 B 液 (0.5 \times SSC, 0.1% SDS, pH 7.4), 每张芯片需要 25 mL B 液。取出膜片, 放入 B 液中, 55 °C 洗膜 10 min。取出膜片, 放入 10 mL POD 溶液 (5 μ L POD 母液 + 10 mL A 液) 中, 置于摇床上, 室温下轻摇 45 min。A 液 25 μ L 室温下轻摇洗膜 5 min; 重复洗一次; C 液 (0.1 mol/L 柠檬酸钠, pH 7.4) 25 mL 室温下轻摇 3 min。新鲜配制并按顺序加入以下试剂: 19 mL C 液 + 1 mL TMB + 10 μ L 3% 双氧水, 室温下避光显色 15 ~ 30 min。芯片置于清水中 3 ~ 5 min, 终止显色。结果判读: 当质控点阳性对照探针下处呈现蓝紫色斑点而阴性对照探针处无显色时, 即可判定杂交显色结果。若野生型探针有杂交信号而突变型探针无杂交信号或者野生型探针的杂交信号远远强于突变型探针, 则说明该位点无突变发生; 反之, 则说明该位点发生了相应的突变。

1.11 膜芯片检测 应用多重 PCR - 膜芯片技术检测 52 例结核杆菌临床分离株 DNA, 结果与传统药敏试验相比较。

2 结果

2.1 单基因 PCR 条件优化 (表 1, 图 1、2) 对影响 PCR 反应的条件如退火温度、引物浓度等进行优化, 以 *gyrA* 基因为例, 扩增产物为 199 bp, 如图 1 所示, 不同退火温度 45.8 ~ 66 °C 均出现 199 bp 的条带, 均无非特异性扩增, 但 45.8、66 °C 时产物量少。因此, *gyrA* 基因退火温度可选择在 54 ~ 61.4 °C。如图 2 所示, 不同引物浓度 0.3 ~ 5 μ L 均出现 199 bp 的条带, 产物量相当, 但 1 ~ 5 μ L 时可见引物二聚体。因此, 将 *gyrA* 基因最佳引物浓度确定为 10 μ M, 加入量可在 0.3 ~ 0.5 μ L。同样的, 其余 11 对引物, 分别扩增 *katG*、*inhA*、*ahpC* 启动子 *rpoB*、*rpsL*、*rrs*、*embB*、*pncA* 耐药相关基因可变区, 经过优化后, 各单基因 PCR 最终共同选择 58 ~ 60 °C 作为退火温度, 引物终浓度为 200 pmol/L, 镁离子终浓度为 1.5 mmol/L,

Taq 酶浓度为 1 U/25 μ L 作为单基因 PCR 的最优条件。



图 1 *gyrA* 基因 PCR 退火温度梯度

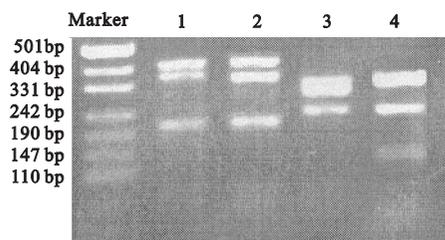


图 2 *gyrA* 基因引物浓度梯度

表 1 多重 PCR 反应体系 (μ L)

简写	耐药基因	扩增长度 (bp)	引物加入量	dNTP	10 \times Buffer	Taq 酶	模板	ddH ₂ O	总体积
rpoB	<i>rpoB</i>	401	P ₁ P ₂	1.0					
rke	<i>katG</i>	355	P ₁ P ₂	0.5	3.0	6.0	0.5	4	31.5
embB	<i>embB</i>	200	P ₁ P ₂	1.0					
inhA	<i>inhA</i>	405	P ₃ P ₄	1.0					
ahpG	<i>ahpG</i>	345	P ₁ P ₂	0.5	3.0	6.0	0.5	4	31.5
gyrA	<i>gyrA</i>	199	P ₁ P ₂	1.0					
rrs	<i>rrs</i>	318	P ₃ P ₄	1.0					
rpsL	<i>rpsL</i>	292	P ₁ P ₂	1.5	3.0	6.0	0.5	4	30.5
pncA	<i>pncA</i>	229	P ₃ P ₄	0.5					
pncA	<i>pncA</i>	344	P ₁ P ₂	1.5					
pri	<i>rrs</i>	244	P ₁ P ₂	1.0	3.0	6.0	0.5	4	30.5
inhA	<i>inhA</i>	132	P ₁ P ₂	0.5					

2.2 多重 PCR (图 3) 按照单基因 PCR 反应条件优化的方法, 12 对引物分 4 管在同一条件下进行 PCR 反应, 对多重 PCR 退火温度、引物浓度进行优化, 获得最佳的多重 PCR 反应体系; 所有引物的浓度均为 10 μ mol/L, dNTP 各 2.5 mmol/L, Taq 酶为 5 U/ μ L。反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 50 s, 60 °C 45 s, 72 °C 50 s, 共计 35 个循环, 72 °C 10 min。



注: 1、2、3、4 分别代表表 1 中 *rke*、*ahpG*、*rpsL*、*pri*。

图 3 多重 PCR 电泳结果

2.3 DNA 序列测定结果 12 对引物的 PCR 产物的 DNA 序列测定所得的序列片段与 NCBI Genbank 数据库进行在线 BLAST 比对, 结果与数据库中结核杆菌 H37Rv 标准序列的符合率均 >96%, 表明产物与目的序列具有高度同源性。

2.4 膜芯片检测结果与传统药敏试验比较 药敏试验显示耐药的 43 株临床分离菌株, 膜芯片检测有 42 株判为耐药, 灵敏度为 95.35%。药敏试验显示敏感的 9 株临床分离菌株, 膜

芯片检测均判为敏感,特异度为 100%。其中膜芯片检测的耐药种类与药敏试验耐药种类完全一致率为 53% (23/43), 18 株检测结果部分相同。

3 讨论

痰培养 + 药敏试验是临床上广泛采用的判断结核杆菌耐药性的金标准。由于结核杆菌生长缓慢,尤其是耐药菌株的生长更为缓慢,致使药敏结果是结果需 6~8 周,不能在患者治疗的初期及时地指导临床合理用药。现已确定耐药的抗结核药物主要是异烟肼、利福平、乙胺丁醇、链霉素、吡嗪酰胺、喹诺酮类等⁽³⁾,并已证明了结核杆菌的耐药性分别与 katG、inhA、ahpC、rpoB、embABC、rpsL、rrs、pncA、gyrA B 等基因突变有关⁽⁴⁻⁸⁾。

多重 PCR 可节省模板,提高效率。首先,在多重 PCR 引物设计时确保反应中所有的引物有相近的溶解温度,引物之间不会发生相互作用。其次,根据以下原则对多重 PCR 进行优化⁽⁹⁾:第一,确保所有的靶位点可以用相同的 PCR 程序在单个的反应中得到有效的扩增;第二,在使用相同的 PCR 程序和反应条件的前提下,对单个 PCR 中每对引物的量进行优化以达到最大的扩增效率;第三,平衡多重 PCR 中每对引物的量,使之对每个靶位点都能获得足够的扩增量。

本研究膜芯片检测 23 株耐药株的耐药种类与药敏试验耐药种类完全一致率为 53.5% (23/43),比前期研究中试剂盒的 15.0%⁽¹⁾有明显提高,其中膜芯片对利福平耐药的检出率和准确率均达到 100%,这与利福平耐药基因的突变相对集中、探针的合理设计以及耐药机制主要为基因突变有关。

总之,本研究通过多重 PCR 反应在同一反应条件下有效地扩增了结核杆菌 9 个耐药基因,为膜片杂交检测提供了良好的前

提。该方法从 PCR 扩增到膜杂交结果判断仅需 1 d 时间,用生物素代替荧光作为标记,降低了检测成本,并可根据需要灵活调整、调换探针,具有简便经济、准确快速、易于保存等优点,对指导临床医生及早用药较有价值,具有广阔的应用前景。

参考文献

- (1) 韦世录,何晓,何敏,等.利用反向杂交膜片检测结核杆菌多耐药基因的研究[J].广西医科大学学报,2008,25(2):202-204.
- (2) 何敏,万逢洁,周凌云,等.反向杂交膜片检测结核菌耐利福平基因突变[J].中国公共卫生,2005,21(12):1420-1422.
- (3) Felmlee TA, Liu Q, et al. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance: comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33: 1617-1623.
- (4) 崔振玲,景奉香,胡忠义,等.用 DNA 芯片快速检测结核杆菌对异烟肼的耐药性[J].中华检验医学杂志,2003,26(4):244.
- (5) Rudi R, Hamidou T, Hans D B, et al. Evaluation of the INNO-LIPA Rif TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin [J]. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 1997, 41(10):2093-2098.
- (6) Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [M] // Hatful GF, Jacobs Jr WR. Molecular Genetics of Mycobacteria, Washington DC: ASM Press, 2000: 235-251.
- (7) Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 9869-9874.
- (8) 黄四邑,邱望龙,潘智灵,等.聚合酶链反应-单链构象多态性技术检测多药结核分支杆菌 ropB、katG、rpsL 突变的研究[J].中国防痨杂志,2001,23(6):341-343.
- (9) J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版,北京:科学出版社,2002:698-699.

收稿日期:2011-02-09

(郭长胜编辑 王奕校对)

【调查报告与分析】

妇产科围手术期患者抗菌药物应用时间分析

朱淑平¹, 宫建², 侯海燕¹, 薛红芳¹

摘要:目的 探讨三级甲等医院妇产科围手术期患者抗菌药物的应用时间,评估抗菌药物的合理应用状况。方法 随机抽取天津市某三级甲等医院 2010 年 6 月-2011 年 6 月妇产科围手术期患者 300 例,采用 SPSS 16.0 软件进行抗菌药物应用时间统计分析。结果 I 类切口患者 51 例,II 类切口患者 249 例,抗菌药物应用率为 100%,用药时间为 (6.7 ± 2.9) d,61 例患者用药时间分布不恰当,其中 21.31% (13/61) 的患者术前未用药,19.67% (12/61) 的患者术前用药大于 2 h; 14.75% (9/61) 患者手术时间超过 3 h,但术中无追加用药。结论 需加强该三级甲等医院妇产科手术患者抗菌药物应用时间的管理。

关键词: 妇产科; 围手术期; 抗菌药物; 合理用药; 时间分布

中图分类号: R 978.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)04-0427-02

Application time of antibacterials for gynecologic and obstetric patients during peroperative period ZHU Shu-ping, GONG Jian, HOU Hai-yan, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force (Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To assess the application time of antibacterials for gynecologic and obstetric patients during peroperative period for rational drug use among the patients. **Methods** Data of 300 patients undergoing gynecologic or obstetric operation were randomly selected from June 2010 to June 2011 from a first-class hospital at grade 3 in Tianjin. The data of application time of antibacterials was studied retrospectively. **Results** Fifty-one patients with class I incision and 249 with class II incision had history of antibacterials use during peroperative period with an average usage time of 6.7 ± 2.9 days. Of all patients 61 were applied antibacterials at unreasonable time, of which 21.31% without antibacterials before the operation, 19.67% with antibacterials 2 hours earlier before the operation and 14.75% without additive medicine during the