

基于 *hsp65* 基因的 PCR-RFLP 用于快速鉴定分枝杆菌菌种的初步研究

王心 张媛媛 陈保文 刘志广 赵秀芹 王国治 李月红 万康林

【摘要】 目的 基于 *hsp65* 基因的 PCR-限制性酶切片长度多态性(PCR-RFLP)用于快速鉴定分枝杆菌菌种的方法的建立和评价。方法 选择分枝杆菌 *hsp65* 基因作为目的基因,对分枝杆菌标准株进行 PCR 扩增,扩增产物经 Hae III 和 Bstp I 两种限制性内切酶酶切,酶切产物采用 4% MetaPhor 琼脂糖凝胶电泳,根据电泳条带位置,计算条带分子量,确定不同菌种的特异指纹图谱。结果 共对 40 种(株)分枝杆菌进行分析,6 株结核分枝杆菌复合体菌株呈现两种指纹图谱,34 株非结核分枝杆菌标准株均具有唯一的指纹图谱。结论 基于 *hsp65* 基因的 PCR-RFLP 可用于分枝杆菌菌种的快速鉴定,且方法简便,易于标准化。

【关键词】 分枝杆菌; 菌种鉴定; PCR-限制性酶切片长度多态性

Preliminary study on rapid identification the species of *Mycobacteria* by PCR-restriction fragment length polymorphism based upon *hsp65* gene WANG Xin*, ZHANG Yuan-yuan, CHEN Bao-wen, LIU Zhi-guang, ZHAO Xiu-qin, WANG Guo-zhi, LI Yue-hong, WAN Kang-lin. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China
Corresponding author: WAN Kang-lin, Email: wankanglin@icdc.cn; State Key Laboratory for Infectious Disease Control and Prevention; National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; LI Yue-hong, Email: liyuhong@sina.com; Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

【Abstract】 Objective To create and evaluate the PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) based on *hsp65* gene as a method for rapid identification of *Mycobacteria* to the species level. **Methods** *hsp65* gene was amplified from the DNA of mycobacterial reference strains and the PCR products were subjected to digestion by two restriction endonucleases Hae III and Bstp I, then loaded onto a 4% MetaPhor agarose. The size of the restricted fragments of each species (strains) was determined according to the position of the fragments on the gel, by which the differential DNA fingerprint was confirmed. **Results** A total of 40 *Mycobacterium* species (strains) was analyzed, in which six reference strains of *Mycobacterium tuberculosis* Complex had two different electrophoresis patterns, and thirty-four reference species of non-tuberculosis *Mycobacteria* had unique pattern. **Conclusion** PCR-RFLP Based upon *hsp65* gene can be used for identification of *Mycobacterium* species, and the method is more rapid and simple and easy-to-use for mycobacterial species identification.

【Key words】 *Mycobacterium*; Species identification; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

非结核分枝杆菌(non-tuberculosis *Mycobacteria*)是指除结核分枝杆菌复合体(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)(包括结核、牛、田鼠和非洲分枝杆菌)以及麻风分枝杆菌以外的分枝杆菌,包括非致病性分枝杆菌在内^[1]。结核分枝杆菌和一

些致病性非结核分枝杆菌均可以引起肺部病变和全身其他部位病变,且症状类似,临床上鉴别诊断困难,而二者的鉴别对于治疗及预后意义重大。另外,某些非结核分枝杆菌是人体寄生菌,而非致病菌,当上呼吸道存在这些寄生菌的时候,往往导致痰菌(涂片抗酸染色和/或细菌培养)阳性,未经菌种鉴定的检验报告又常使临床医生作出错误判断,行使不适当的抗结核治疗,造成患者的痛苦和医疗资源浪费。目前,常用培养特性和生化反应对分枝杆菌临床分离株进行菌种鉴定,不仅耗时费力,且易受多种条件影响导致结果不够准确^[2]。本研究选择 *hsp65* 基因作为目的基因,通过 PCR-限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.06.019

基金项目:国家自然科学基金(30800029)

作者单位:130118 长春,吉林农业大学动物科学技术学院(王心、李月红);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所结核病研究室传染病预防控制国家重点实验室(张媛媛、刘志广、赵秀芹、万康林);中国生物制品检定所(陈保文、王国治)

通信作者:万康林, Email: wankanglin@icdc.cn; 李月红, Email: liyuhong@sina.com

PCR-RFLP)分析,对分枝杆菌标准菌株进行检测,旨在建立方便、快速、准确的分枝杆菌菌种鉴定方法。

材料与方 法

1. 菌株来源:非结核分枝杆菌标准株(表1)、结核分枝杆菌标准株(H37Rv)和牛分枝杆菌(93006)均来自于中国药品生物制品检定所分枝杆菌实验室。

表1 40种(株)分枝杆菌标准菌株hsp65基因酶切条带分子量表

菌株编号	菌株名称	ATCC编号	Hae III	Bstp I
95001	鸟分枝杆菌	ATCC25291	235,210	125,100
95002	胞内分枝杆菌	ATCC13950	235,130,100	145,130,60
95003	蟾分枝杆菌	ATCC19250	135,120,85	160,100,60
95005	土分枝杆菌	ATCC15755	325,120	180,130
95008	施氏分枝杆菌	ATCC27962	235,130,80	140,100,70
95009	次要分枝杆菌	ATCC23292	440	160,125
95012	产鼻疽分枝杆菌	ATCC35753	240,120,80	130,115,57,52
95013	堪萨斯分枝杆菌	ATCC12478	235,210	125,100,80
95014	海分枝杆菌	ATCC927	235,210	145,105,80
95015	猿分枝杆菌	ATCC25275	235,210	180,130
95016	亚洲分枝杆菌	ATCC25276	235,210	110,105
95017	瘰癧分枝杆菌	ATCC19981	235,210	147,129,100
95018	戈氏分枝杆菌	ATCC14470	235,210,85	160,115,60
95019	苏尔加分枝杆菌	ATCC35799	440	130,110,70
95021	脓肿分枝杆菌	ATCC19977	235,210	145,75,56,52
95022	偶发分枝杆菌	ATCC6841	235,120,85	142,121,60,52
95023	耻垢分枝杆菌	ATCC19420	235,130,85	142,125,61
95024	卓分枝杆菌	ATCC11758	235,210	140,80,57,50
95026	爱知分枝杆菌	ATCC27280	325,120	200,70,60,55
95027	金色分枝杆菌	ATCC23366	441	130,120,70,60
95028	楚布分枝杆菌	ATCC27278	235,210	144,90,60
95029	杜氏分枝杆菌	ATCC43910	440	132,127,66,50
95030	转黄分枝杆菌	ATCC14474	235,120	145,100,55
95032	浅黄分枝杆菌	ATCC43909	441	170,89,60
95034	新金色分枝杆菌	ATCC25795	320,130	175,146
95035	奥布分枝杆菌	ATCC27023	235,210	140,90,60
95037	罗德岛分枝杆菌	ATCC27024	320,120	160,125,60
95038	东海分枝杆菌	ATCC27282	235,130,85	144,83,60
95039	猪分枝杆菌	ATCC33776	235,210	146,130,96
95041	塞内加尔分枝杆菌	ATCC35796	235,120,80	186,140,51
95043	田野分枝杆菌	ATCC27406	235,130,85	160,145,57
95044	南非分枝杆菌	ATCC33464	235,210	160,60,50
95046	千田分枝杆菌	ATCC19627	325,120	135,90,58
95048	田鼠分枝杆菌	ATCC19422	325,120	135,88,58
95049	非洲分枝杆菌	ATCC25420	235,120,85	150,130,70
95050	母牛分枝杆菌	ATCC29678	235,210	160,60,50
95052	结核分枝杆菌	ATCC35810	235,120,85	150,130,70
95053	结核分枝杆菌	ATCC27294	235,120,85	150,130,70
H37Rv	结核分枝杆菌		235,120,85	150,130,70
93006	牛分枝杆菌		235,120,85	150,130,70

2. 分枝杆菌标准株DNA制备^[3]:取一接种环细菌溶于400 μl TE[10 mmol/L Tris(pH值8.0), 1 mmol/L EDTA]中,细菌破碎采用珠磨法研磨60 s, 12 000 r/min离心5 min,吸取上层液体作为DNA模板。

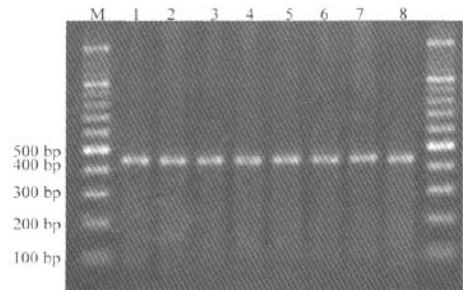
3. PCR扩增^[4]:用引物Tb11(5'-ACCAAC GAT GGT GTG TCC AT-3')和Tb12(5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3')进行PCR扩增,反应体系50 μl,其中PCR预混液25 μl,灭菌水20 μl,引物TB11和

TB12各1 μl,DNA模板3 μl。PCR反应条件设置为预变性94℃ 5 min,变性94℃ 1 min,退火60℃ 1 min,延伸72℃ 1 min,30个循环,最后延伸72℃ 5 min。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,紫外灯下观察结果,产物大小为440 bp。

4. 限制性内切酶酶切鉴定^[4]:将16 μl PCR产物与4 μl Hae III酶切体系(包含5 U Hae III和2 μl 10×酶切缓冲液,以及适量的超纯水,赛百盛基因技术有限公司)充分混匀后,37℃,孵育90 min。Bstp I限制性内切酶酶切鉴定将16 μl PCR产物与4 μl Bstp I酶切体系(包含5 U Hae III和2 μl 10×酶切缓冲液,以及适量的超纯水,赛百盛基因技术有限公司)充分混匀后,60℃,孵育90 min。4% MetaPhor 琼脂糖凝胶电泳,100 V电压电泳2 h,EB染色,扫描照相。使用VisionWorks LS软件进行分子量的计算。根据条带泳动的位置和数量确定不同分枝杆菌菌种的电泳图谱。

结 果

1. hsp65基因PCR扩增:共44种(株)分枝杆菌标准菌株(包括MTBC菌株),PCR扩增结果全部为阳性,产物大小均为440 bp(图1)。



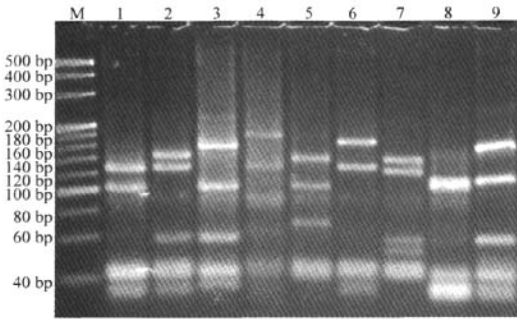
注: M: 100 bp DNA Ladder; 1: H37Rv; 2: 93006; 3: BCG; 4: 95014; 5: 95015; 6: 95016; 7: 95017; 8: 95018

图1 部分分枝杆菌标准菌株(株)hsp65基因PCR结果

2. Hae III酶切分析: hsp65基因PCR产物经Hae III酶切、MetaPhor琼脂糖凝胶电泳可见不同菌株(株)显示不同的指纹图谱(图2)。

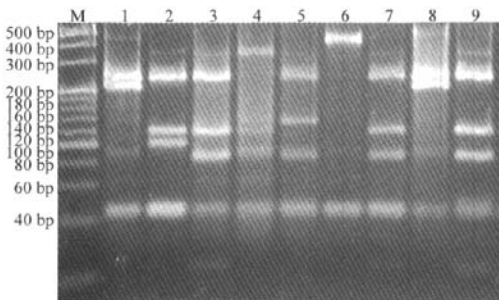
3. Bstp I酶切电泳: hsp65基因PCR产物经Bstp I酶切、MetaPhor琼脂糖凝胶电泳可见不同菌株(株)显示不同的指纹图谱(图3)。

4. Hae III和Bstp I酶切电泳分子量计算:根据凝胶图像上条带泳动的位置,利用VisionWorks LS软件计算酶切条带大小。结合两种限制性内切酶消化产物的电泳图谱,40种(株)分枝杆菌标准菌株共呈现36种图谱,其中6株结核分枝杆菌复合体菌株呈现两种带型,其中包括3株结核分枝杆菌、1株非洲



注: M: 20 bp DNA Ladder; 1: 95001; 2: 95002; 3: 95003; 4: 95005; 5: 95008; 6: 95009; 7: 95012; 8: 95016; 9: 95018

图2 部分分枝杆菌标准菌株(株) *hsp65* 基因 PCR产物 Hae III 酶切分析



注: M: 20 bp DNA Ladder; 1: 95001; 2: 95002; 3: 95003; 4: 95005; 5: 95008; 6: 95009; 7: 95012; 8: 95016; 9: 95018

图3 部分分枝杆菌标准菌株(株) *hsp65* 基因 PCR产物 Bst I 酶切分析

分枝杆菌和1株牛分枝杆菌的指纹图谱一致,1株田鼠分枝杆菌呈现其独特指纹图谱,34种非结核分枝杆菌复合体菌株呈现各自独特指纹图谱(表1)。

讨 论

传统的分枝杆菌细菌学分类、鉴定系统主要以形态和生理生化特征的综合指标为依据,易受多种因素影响,鉴定结果可靠性差,而且需综合指标,操作繁琐,鉴定一株临床分离株费时约4周,有明显局限性。目前,应用分子生物学技术鉴定分枝杆菌菌种不仅快速可靠,而且具有成本低廉,可建立标准化操作程序的优点,成为研究快速鉴定分枝杆菌新方法的热点。针对我国目前的科技水平和临床面临的紧迫问题,建立快速、可靠、成本低廉的细菌学鉴定的标准化方法,无疑是迫切需要尽快解决的问题^[2]。

相对分子质量 65×10^3 热休克蛋白(heat shock protein)是分枝杆菌的一个主要免疫反应蛋白抗原,此抗原既含有分枝杆菌菌种独特的表位,也含有不同分枝杆菌共同的表位,其编码基因 *hsp65* 广泛地存

在于分枝杆菌中,该基因核苷酸序列的多态性总体上大于16S rRNA基因的多态性,适合用于对分枝杆菌菌种类型的区分^[4]。本研究选择 *hsp65* 基因上与保守区相接的一段具有较高多态性440 bp片段,作为PCR扩增区域。PCR产物经限制性内切酶 Hae III 和 Bst I 酶切,产生大小不一的片段,在高分辨率琼脂糖凝胶上呈现不同的指纹图谱,从而判定其菌种类型。在对电泳条带大小进行计算时,为了避免引物二聚体的干扰,忽略了 <40 bp 的条带。本研究的40种(株)分枝杆菌标准菌株共呈现36种图谱,其中6株MTBC、3株结核分枝杆菌、1株非洲分枝杆菌和1株牛分枝杆菌的指纹图谱一致,1株田鼠分枝杆菌呈现其独特指纹图谱,34种非结核分枝杆菌复合体菌株呈现各自独特指纹图谱。对于结核分枝杆菌复合体内菌种之间,由于其遗传特征十分相似^[5],因此除田鼠分枝杆菌外,不能进一步区分。34株非结核分枝杆菌呈现34种酶切图谱,说明 *hsp65* 基因具有很好的区分分枝杆菌菌种的效果,一次PCR,一种或两种限制性内切酶分析可以鉴定至种。但由于本研究所采用的分枝杆菌标准菌株数目有限,而目前已知的分枝杆菌菌种达到百种以上^[6],因此还需要扩大标准菌株数量,开展进一步的研究。

PCR-RFLP是基于PCR的分子生物学方法^[7],由于PCR具有灵敏、简便快速、特异的特点,尤其是少量模板即可进行,临床标本可以直接进行菌种鉴定,省略了细菌培养的步骤,避免了实验室污染的危险。PCR-RFLP涉及的试剂设备简单,价格低廉,耗时较少,在10 h内完成整个过程,操作步骤简便,易于进行质量控制和标准化,因此更适用于大规模流行病学调查以及满足临床快速菌种鉴定的要求。

参 考 文 献

- [1] 张敬熔. 现代结核病学. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [2] 庄玉辉. 非结核分枝杆菌的致病性与鉴定技术的研究进展. 中国防痨杂志, 1994, 16(4): 185-188.
- [3] Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al. Genotypic identification of *Mycobacteria* bunucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J Clin Microbiol, 1993, 31: 2882-2889.
- [4] Brunello F, Ligozzi M, Christelli E, et al. Identification of 54 *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. J Clin Microbiol, 2001, 39: 2799-2806.
- [5] Huard RC, Fabre M, Haas P, et al. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. JB, 2006, 188(12): 4271-4287.
- [6] Katoch VM. Infections due to non-tuberculous *Mycobacteria* (NTM). Indian J Med Res, 2004, 120: 290-304.
- [7] Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al. Rapid identification of *Mycobacteria* to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol, 1993, 31(2): 175-178.

(收稿日期: 2009-03-23)
(本文编辑: 张林东)