

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.04.04

SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线鉴定鸟分枝杆菌方法的建立及初步应用*

王赛赛^a, 潘丽萍^b, 姜广路^c, 李自慧^b, 贾红彦^b, 孙琦^b, 张宗德^b, 刘洋^a(首都医科大学附属北京胸科医院 & 北京市结核病胸部肿瘤研究所 a.流行病学研究室, b.耐药结核病研究北京市重点实验室, c.国家结核病临床实验室, 北京 101149)

摘要:目的 基于 SYBR Green I 荧光染料建立鉴定鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*, MA)的荧光 PCR 熔解曲线法,为临床鉴定 MA 提供简单、准确性高的分子生物学检测方法。方法 以 MA 的特异性插入序列 IS1311 为检测靶标设计引物,在 60 °C 的退火温度下,建立鉴定 MA 的 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线方法,并对 MA 等 21 种分枝杆菌标准株和金黄色葡萄球菌等 5 种常见致病菌进行检测,评价方法的特异性、检测限;以 *hsp65*、16S rDNA 普通 PCR 扩增产物测序分析为“金标准”,鉴定 200 株分枝杆菌临床分离株,评估建立方法鉴定 MA 的准确性。结果 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线方法在 30 个循环内能准确鉴定出 21 种分枝杆菌标准株和 5 种致病菌中的 MA,检测限为 5.6×10^{-2} ng/ μ L。200 株分枝杆菌临床分离株中,以 PCR 测序鉴定出 16 株 MA 和 184 株其他分枝杆菌,以 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线方法鉴定出 15 株 MA 和 185 株非 MA;本研究建立的方法和测序方法对 MA 的鉴定率差异无统计学意义($P > 0.05$);两法符合率为 99.5% (199/200),一致性较高($Kappa$ 值 > 0.75 , $P < 0.01$);建立方法的敏感性为 93.8% (15/16),特异性为 100.0% (184/184),阳性预测值为 100.0% (15/15),阴性预测值为 99.5% (184/185)。结论 以 MA 特异性重复序列 IS1311 为基础建立的 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线方法,具有较高的灵敏度和特异性,为 MA 的临床检测提供新的途径。

关键词:鸟分枝杆菌;SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线;测序

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

Establishment and preliminary application of SYBR Green I fluorescence PCR melting curve method for identification of *Mycobacterium avium*

WANG Saisai^a, PAN Liping^b, JIANG Guanglu^c, LI Zihui^b, JIA Hongyan^b, SUN Qi^b, ZHANG Zongde^b, LIU Yang^a(a. Department of Epidemiology, b. Beijing Key Laboratory for Drug-resistant Tuberculosis Research, c. National Clinical Laboratory on Tuberculosis, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Institute, Beijing 101149, China)

Abstract: Objective To establish a PCR melting curve method for the identification of *Mycobacterium avium* (MA) based on SYBR Green I fluorescent dye, and then provide a simple, accurate molecular biological method for the clinical identification of MA. **Methods** The primers were designed based on the specific insertion sequence IS1311 of MA as the detection target. At the annealing temperature of 60 °C, a SYBR Green I fluorescence PCR melting curve method was established for the identification of MA. The specificity and the detection limit of the established method were evaluated by detecting 21 reference strains of mycobacterium including MA and 5 common pathogens including *Staphylococcus aureus*. Using the sequencing of PCR products of *hsp65* and 16S rDNA as the “gold standard”, 200 clinical isolates of mycobacterium were identified, and then the accuracy of the established method for the identification of MA was evaluated. **Results** The established SYBR Green I fluorescence PCR melting curve method were able to accurately identify MA in 21 reference strains of mycobacterium and 5 pathogenic bacteria within 30 cycles, and the detection limit was 5.6×10^{-2} ng/ μ L. Among 200 clinical isolates of mycobacterium, 16 strains of MA and 184 strains of other mycobacteria were identified by PCR sequencing, while 15 strains of MA and 185 strains of non-MA were identified by the established SYBR Green I fluorescence PCR melting curve method. There was no significant difference in the identification rate of MA between PCR sequencing and the established method in this study ($P > 0.05$), and there were high coincidence rate (99.5%, 199/200) and high consistency ($Kappa$ value > 0.75 , $P < 0.01$) between them. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the established method were 93.8% (15/16), 100.0% (184/184), 100.0% (15/15) and 99.5% (184/185), respectively. **Conclusion** The established SYBR Green I fluorescence PCR melting curve method based on the specific repeat sequence IS1311 of MA has high sensitivity and

* 基金项目:国家自然科学基金(81902024);“十二五”国家科技重大专项(2015ZX10004801-003;2017ZX10201301-004);北京市自然科学基金(7192038);北京市医管局登峰人才项目(DFL20181601);通州区运河人才计划(YH201807;YH201921)。

作者简介:王赛赛,1990年生,女,硕士研究生,研究方向为结核病分子流行病学研究。

通信作者:刘洋,博士,E-mail:lygl1973@126.com;张宗德,博士,E-mail:zsd417@163.com。

specificity, which provides a new way for the clinical detection of MA.

Key words: *Mycobacterium avium*; SYBR Green I fluorescence PCR melting curve; sequencing

广泛存在于自然界中的非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM)主要侵犯宿主肺、淋巴结、骨骼、关节、皮肤和软组织等并造成全身播散^[1]。鸟-胞内分枝杆菌复合群(*Mycobacterium avium-intracellulare* complex, MAC)是我国临床标本中分离率最高的 NTM^[2]。其中,鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*, MA)占艾滋病患者合并 MAC 感染的 98%^[3],合并 NTM 感染的 95%以上^[4],在医学界引起广泛重视。

由 MAC 感染引起的鸟分枝杆菌病,早期症状不明显,多是发展到中后期通过 X 光片和 CT 检查才被发现^[5]。随着分子生物学技术的发展,PCR 技术不断改进和完善,特别是实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)的逐步应用为 MA 在基因诊断水平的研究提供了重要技术支撑。与普通 PCR 相比,基于 SYBR Green I 荧光染料的 qPCR 熔解曲线法可缩短检测时间、降低交叉污染的风险^[6]。因此,本研究基于 SYBR Green I 荧光染料建立鉴定 MA 的 qPCR 方法,并以 PCR-DNA 直接测序技术为“金标准”,评估其对临床分离株的鉴定效果,为今后临床应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株种类及来源 21 种分枝杆菌标准菌株包括鸟分枝杆菌(ATCC 25291)、胞内分枝杆菌(ATCC 13950)、脓肿分枝杆菌(ATCC 19977)、龟分枝杆菌(ATCC 14472)、堪萨斯分枝杆菌(ATCC 12478)、戈登分枝杆菌(ATCC 14470)、偶发分枝杆菌(ATCC 6481)、草分枝杆菌(ATCC 11758)、金色分枝杆菌(ATCC 23366)、瘰疬分枝杆菌(ATCC 19981)、浅黄分枝杆菌(ATCC 43909)、耻垢分枝杆菌(ATCC 19420)、结核分枝杆菌(ATCC 27294)、马尔摩分枝杆菌(ATCC 29571)、猿猴分枝杆菌(ATCC 25275)、苏加分枝杆菌(ATCC 35799)、猪分枝杆菌(ATCC 33776)、土地分枝杆菌(ATCC 15755)、微黄分枝杆菌(ATCC 14474)、迪氏分枝杆菌(ATCC 19340)、施氏分枝杆菌(ATCC 27962)。5 种常见致病菌包括金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、大肠埃希菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、藤黄微球菌(CMCC 28001)、腐生葡萄球菌(ATCCBAA750)。21 种分枝杆菌标准菌株、藤黄微球菌均来自首都医科大学附属北京胸科医院国家结核病临床实验室;金

黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、腐生葡萄球菌均来自首都医科大学附属北京胸科医院检验科。200 株分枝杆菌临床分离株分离自 2019 年 1 月至 10 月首都医科大学附属北京胸科医院疑似分枝杆菌感染患者的痰标本,所有样本经 40 g/L 氢氧化钠处理后,接种于酸性罗氏培养基,分离株通过测定 16S rDNA、*rpoB*、*hsp65* 和 ITS-1 中 2 个序列进行菌种鉴定,并采用 Middlebrook 7H9 培养基(含 10% 甘油)保存于-70 °C 超低温冰箱。

1.2 主要试剂及仪器 SuperReal 荧光定量预混试剂增强版(SYBR Green)、2×Taq PCR Master Mix、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)(北京天根生化科技公司);PCR 仪、Universal Hood II 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),ABI 3730XL 基因测序仪、QuantStudio 7 Flex 实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),超微量紫外分光光度计(美国 ThermoFisher Scientific 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株处理及 DNA 提取 21 种分枝杆菌标准菌株和 200 株分枝杆菌临床分离株接种于中性罗氏培养基;5 种常见致病菌接种于哥伦比亚血琼脂平板。待培养至对数生长期,刮取一接种环细菌至 500 μL 灭菌去离子水中,煮沸 15 min,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,分装后-20 °C 保存备用。

1.3.2 引物设计 依据参考文献[7-8]及分枝杆菌菌种鉴定 DNA 序列比对系统(<http://172.16.0.32:8081/NLC/pages/frame/home.jsp#>)确定 MA 的特异序列 IS1311 和 NTM 的通用引物序列;用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)检测序列特异性,用 Oligo 7.0 软件设计、评估引物,所有引物由上海生工公司合成。见表 1。

表 1 鸟分枝杆菌特异引物及 NTM 通用引物序列

基因	引物序列(5'→3')	熔解	产物
		温度 (°C)	长度 (bp)
IS1311-3	F:GCATCTCCAAAAGCGAGCT	58.8	109
	R:CGAGGAACACATACGGGAAG	59.8	
<i>hsp65</i> ^[8]	F:ACCAACGATGGTGTGCCAT	59.60	441
	R:CTTGTCGAACCGCATACCCT	60.11	
16S rDNA	F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	56.92	922
	R:CCCGTCAATTCATTTGAGTTT	57.48	

注:F,正向引物;R,反向引物。

1.3.3 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法的建立

总反应体系 20 μL , 包括 2 \times SuperReal 预混试剂增强版 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ IS1311-3 基因上、下游引物各 0.6 μL 、样本 DNA 2 μL (终浓度为 0.56 $\text{ng}/\mu\text{L}$)、50 \times Rox Reference Dye 0.4 μL 、ddH₂O 6.4 μL ; 阴性对照为 ddH₂O 代替模板 DNA, 其余条件均相同。对 21 种分枝杆菌标准菌和 5 种常见致病菌的 DNA 分别加样后用涡旋振荡器振荡混匀、低温超速离心机离心数秒, 再快速转至 QuantStudio 7 Flex 实时定量 PCR 仪中进行扩增。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ (已在温度分别为 59.5 $^{\circ}\text{C}$ 、59.8 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、61 $^{\circ}\text{C}$ 、62 $^{\circ}\text{C}$ 、63 $^{\circ}\text{C}$ 的梯度 PCR 中验证为最佳退火温度) 32 s (采集荧光信号), 扩增 40 个循环, 最后熔解曲线以 1.6 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 的速度完成 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、95 $^{\circ}\text{C}$ (采集荧光信号) 15 s 的程序。对所有标准菌株的扩增曲线和熔解曲线进行分析, 以样本在 30 个循环内有扩增曲线、在对应熔解温度 (melting temperature, T_m) 出现相应的熔解峰为检出标准, 判定为 MA。将阳性扩增产物送生工公司进行琼脂糖凝胶电泳后切下目的条带, 并用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化, 将纯化成功样本经连接反应、转化反应后用 SanPrep 核酸纯化套件 (质粒提取) 试剂盒进行质粒提取, 用即用 PCR 扩增试剂盒进行扩增鉴定、琼脂糖凝胶电泳, 将检测成功样本进行 BDT 反应后置于 YG96 梯度 PCR 仪中进行扩增, 扩增产物用酒精纯化后加入高度去离子甲酰胺混匀, 最后转至 ABI 3730XL 基因测序仪进行 Sanger 克隆测序, 结果与 GenBank 号为 U16276.1 的序列进行比对。

1.3.4 普通 PCR 基因测序进行菌种鉴定 对 21 种分枝杆菌标准菌株的 *hsp65* 基因、5 种常见致病菌的 16S rDNA 基因和 200 株临床分离株的 *hsp65* 和 16S rDNA 基因进行普通 PCR 扩增测序。普通 PCR 总反应体系 50 μL , 包括 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 1 μL 、样本 DNA 2 μL (终浓度为 0.23 $\text{ng}/\mu\text{L}$)、ddH₂O 21 μL ; 阴性对照为 ddH₂O 代替模板 DNA, 其余条件均相同。菌株 DNA 分别加样后使用涡旋振荡器振荡混匀, 低温超速离心机离心数秒再快速转至 Bio-Rad PCR 仪进行扩

增。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s、35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。21 种分枝杆菌标准菌及 5 种常见致病菌的 DNA 各取 10 μL 扩增产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 同时将所有菌株扩增产物送生工公司进行琼脂糖凝胶电泳后切下目的条带, 并用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化, 将纯化成功样本进行 BDT 反应后置于 YG96 梯度 PCR 仪中进行扩增, 扩增产物用酒精纯化后加入高度去离子甲酰胺混匀, 最后转至 ABI 3730XL 基因测序仪进行 Sanger 双向测序, 正反向测序片段采用 DNAMAN 8 软件拼接, 结果用 BLAST 与 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中相应菌种 *hsp65* 和 16S rDNA 序列进行同源性分析。

1.3.5 初步应用 用 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法对 200 株临床菌株 (每个样本平行 3 份) 进行检测, 记录扩增结果。

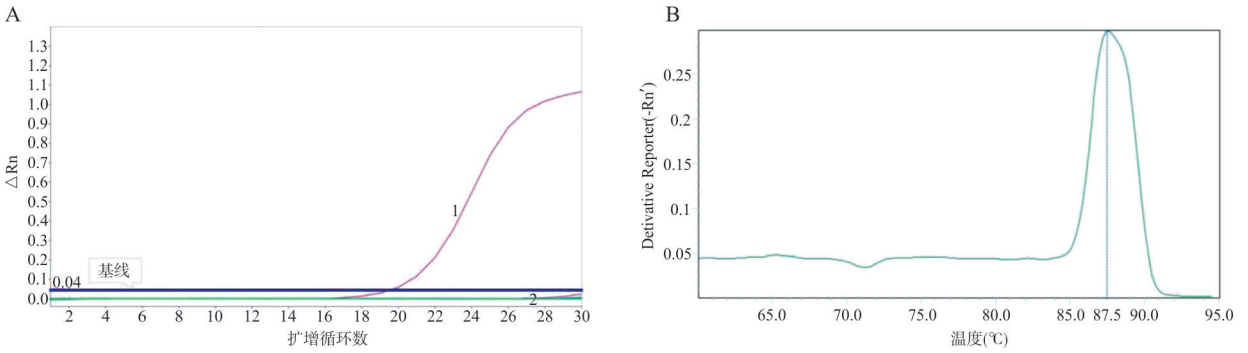
1.4 统计学分析 用 SPSS 24.0 软件进行。鉴定结果用株和百分率表示, 用连续校正的 χ^2 检验分析 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法鉴定出 MA 的百分率与以 *hsp65*、16S rDNA 基因扩增测序后鉴定出 MA 的百分率的差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。将测序结果作为金标准, 比较建立的方法鉴定 MA 的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和符合率。一致性用 Kappa 检验, $Kappa < 0.4$, 认为一致性较差; $0.4 \leq Kappa < 0.75$, 认为一致性一般; $Kappa \geq 0.75$, 认为一致性较好。

2 结果

2.1 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法的建立

2.1.1 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法的特异性 该方法仅与 MA 标准菌株在 30 个循环内有扩增曲线, 与其他 20 种分枝杆菌标准株、5 种常见致病菌均无扩增曲线, 特异性为 100%。见图 1。

2.1.2 MA 标准菌株 IS1311-3 扩增产物测序 将 MA 标准菌株 IS1311-3 扩增产物的测序结果与 GenBank 数据库中的 U16276.1 进行比对, 其一致性为 100%, 见图 2。说明本研究中设计的特异性引物以 MA 为模板可扩增出 IS1311 序列, 扩增效果良好。



注:A,扩增曲线;B,熔解曲线分析;1,MA;2,其他 20 种分枝杆菌标准株和 5 种常见致病菌及阴性对照;基线,3~15 个循环的荧光信号; R_n ,荧光报告基团发射的荧光值与 ROX 发射的荧光值的比值; ΔR_n , R_n 扣除基线(背景荧光信号)后获得的标准化的荧光值;Derivative Reporter (- R_n'),荧光随温度变化的速率,即对 R_n 进行求导。

图 1 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法鉴定 MA 特异性的扩增曲线及 MA 的熔解曲线

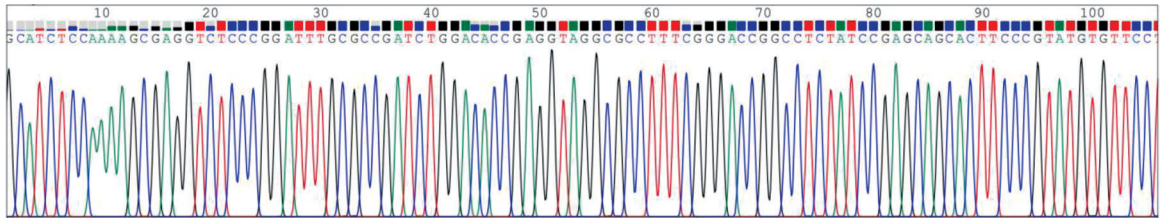
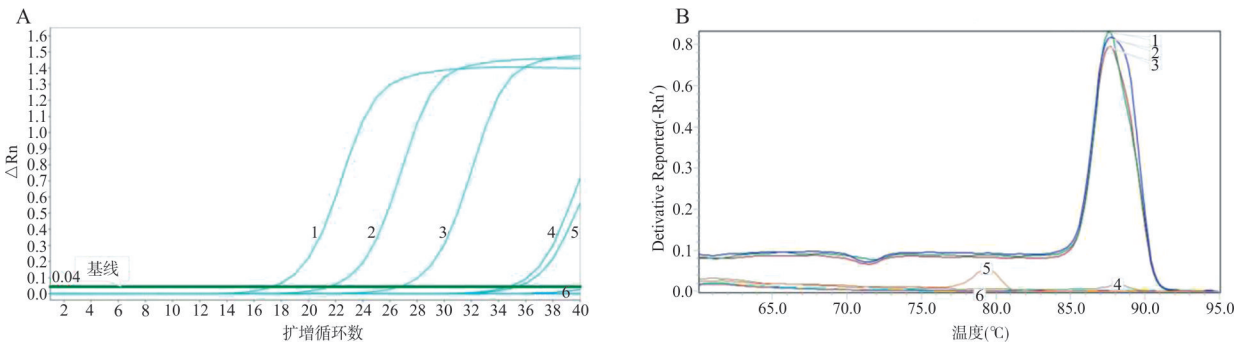


图 2 MA 标准菌株 IS1311-3 DNA 扩增产物的测序结果

2.1.3 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法的检测限 用微量紫外分光光度计测量 MA 标准菌株 DNA 浓度为 $5.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$,将该 DNA 溶液用 ddH₂O 以连续 10 倍等比稀释 (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 等),用建立的方法进行检测,以在 30 个循环内有扩增曲线、在对

应溶解温度出现相应的溶解峰为检出标准,确定 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法检出 MA 的最低模板浓度为 $5.6 \times 10^{-2} \text{ ng}/\mu\text{L}$,30 个循环之后虽有扩增曲线,但无溶解曲线。见图 3。



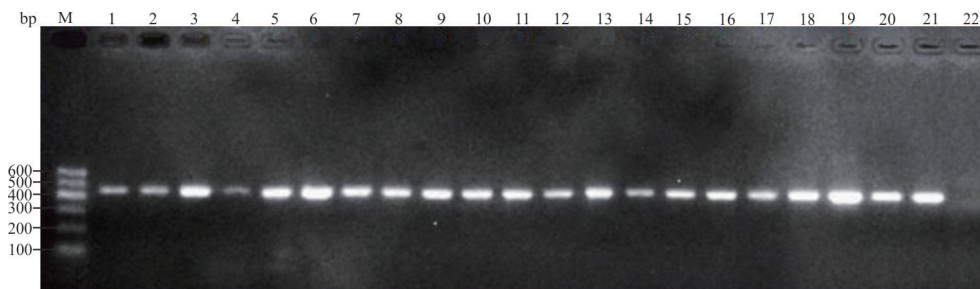
注:A,扩增曲线;B,熔解曲线分析;1~5,菌液浓度分别为 5.6 、 5.6×10^{-1} 、 5.6×10^{-2} 、 5.6×10^{-3} 、 $5.6 \times 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{L}$;6,菌液浓度分别为 5.6×10^{-5} 、 5.6×10^{-6} 、 5.6×10^{-7} 、 5.6×10^{-8} 、 5.6×10^{-9} 、 $5.6 \times 10^{-10} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 和阴性对照;基线,3~15 个循环的荧光信号; R_n ,荧光报告基团发射的荧光值与 ROX 发射的荧光值的比值; ΔR_n , R_n 扣除基线(背景荧光信号)后获得的标准化的荧光值;Derivative Reporter (- R_n'),荧光随温度变化的速率,即对 R_n 进行求导。

图 3 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法鉴定 MA 检测限的扩增曲线和熔解曲线

2.2 普通 PCR 扩增结果

2.2.1 标准菌株测序结果 通用引物 *hsp65* 扩增 21 种标准菌株的 DNA,均获得 441 bp 产物(图 4);通用引物 16S rDNA 扩增 5 种常见致病菌的 DNA,均获得 922 bp 产物(图 5)。21 种标准菌株及 5 种常

见致病菌的扩增产物测序后,与 GenBank 数据库中相应菌种 DNA 比对,其一致性均在 99% 以上。其中,MA 的测序结果与 GenBank 数据库中的 AF281650.1 比对,一致性达 100%。



注: M, DNA marker; 1~22, 苏加、迪氏、猿猴、土地、马尔摩、耻垢、瘰癧、施氏、金色、草、微黄、猪、浅黄、堪萨斯、偶发、龟、戈登、鸟、结核、胞内、脓肿分枝杆菌扩增产物及阴性对照。

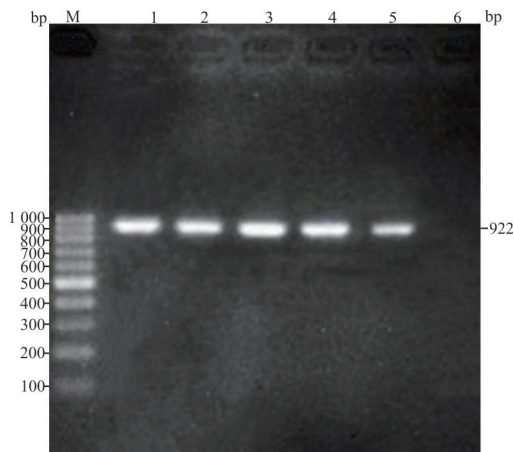
图 4 通用引物 *hsp65* PCR 扩增标准菌株产物电泳

(15/16)、特异性为 100.0%(184/184)、阳性预测值为 100.0%(15/15)、阴性预测值为 99.5%(184/185)。

3 讨论

我国不同地区开展的研究均表明 MAC 是我国主要流行的 NTM^[9-10]。MA 是人兽共患传染病病原体^[11],在人类中可导致肺部、软组织、儿童淋巴结、皮肤感染等^[12-13]。MA 感染不仅在临床表现和组织病理上缺乏特异性^[13],与胞内分枝杆菌的耐药谱还存在明显差异^[14]。因此,MA 的菌种鉴定对确定传染源、分析传播途径、制定合理治疗方案具有重要意义。

以生化试验为主的鉴定 NTM 的技术,因其操作复杂、耗时长、结果准确率低的原因,现已不常使用;ELISA 等血清学诊断方法用于 NTM 的鉴定仍处于初级阶段^[15]。依据鉴定原理,目前菌种鉴定的方法有 2 类:一类是分析分枝杆菌组成成分差异的技术,如:高效液相色谱技术、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)等;一类是以 PCR 为基础的分子诊断技术,如:PCR-DNA 直接测序技术、PCR-核酸探针技术等^[16]。前者由于操作复杂、分析设备价格昂贵等原因在临床中普及受到限制。随着分子生物学技术的发展,PCR-DNA 测序的方法为菌种鉴定的“金标准”^[16],为弥补单一 DNA 测序鉴定分枝杆菌菌种方法的不足,常联合 *hsp65* 和 16S rDNA 等 2 个及以上的分子标识以提高分辨力,但因价格昂贵,难以广泛应用于临床。基于 SYBR Green I 荧光染料的 PCR 熔解曲线法相较于其他分子方法,如 PCR-核酸探针技术、DNA 芯片技术、PCR-指纹图谱等,价格更低廉、操作更简便。IS1311 是仅存在于 MA 中的特异性插入序列^[17],对 MA 的鉴定和分型具有较高的诊断价值,已用于多项流行病学研究^[18-19]。因此,本研究以 IS1311 为基础,建立基



注: M, DNA marker; 1~6, 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、藤黄微球菌、腐生葡萄球菌及阴性对照。

图 5 通用引物 16S rDNA PCR 扩增 5 种常见致病菌产物电泳

2.2.2 200 株临床分离株测序结果 经 *hsp65*、16S rDNA 扩增及测序,共鉴定出 16 株 MA,184 株非 MA,包括胞内分枝杆菌 100 株、脓肿分枝杆菌 30 株、龟分枝杆菌 2 株、堪萨斯分枝杆菌 10 株、戈登分枝杆菌 6 株、副戈登分枝杆菌 2 株、偶发分枝杆菌 2 株、结核分枝杆菌 24 株、马赛分枝杆菌 4 株、其他分枝杆菌 4 株(副瘰癧分枝杆菌、马尔摩分枝杆菌、施氏分枝杆菌、猪分枝杆菌各 1 株)。

2.3 两种方法鉴定临床分离株结果的比较 200 株临床分离株经 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法检测,有 15 株在 30 个循环内扩增曲线阳性且熔解曲线分析均显示在 87.5 °C 左右形成单一熔解峰,鉴定为 MA;有 185 株扩增曲线阴性,鉴定为非 MA。以 *hsp65*、16S rDNA 测序为金标准,评估建立的 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法鉴定 MA 的准确性。与测序结果相比,本法 MA 检出率差异无统计学意义 ($P > 0.05$);两法符合率为 99.5%(199/200),一致性较高, $Kappa$ 值为 0.965, $P < 0.01$;在 30 个循环内,鉴定 MA 的敏感性为 93.8%

于 SYBR Green I 荧光染料的鉴定 MA 的 PCR 熔解曲线方法。

IS1311 是 MA 中含有转座酶基因的特异性插入元件。Shin 等^[17]研究表明, IS1311 均存在于 MA 的 4 个亚种(avium 亚种、副结核亚种、silvaticum 亚种和 hominisuis 亚种), 而与之形态和生化特性相近的胞内分枝杆菌和其他 NTM 中均不存在 IS1311。Chae 等^[7]也证实其诊断 MA 具有 100% 的准确性。插入序列 IS1245 虽被报道有较高诊断价值, 但并不存在于鸟分枝杆菌副结核亚种^[20]。本研究基于 IS1311 特异序列设计引物建立的方法在 30 个循环内可准确鉴定出 21 种分枝杆菌标准株及 5 种致病菌中的 MA, 检测 MA 的检测限为 5.6×10^{-2} ng/ μ L。

本研究选择目前应用广泛的荧光染料 SYBR Green I 建立鉴定 MA 的 PCR 熔解曲线方法, 具有简单、通用性好、价格低廉的优势, 更有利于在临床实践中推广。值得注意的是, 由于 SYBR Green I 可与所有双链 DNA 相结合, 扩增后需要进行熔解曲线分析, 从而排除引物二聚体或非特异产物对测定结果的影响^[21]。本研究在 60 °C 的最佳退火温度下, 对 IS1311-3 扩增后的产物进行熔解曲线分析, 结果显示为单峰(T_m 值 87.5 °C), 无二聚体或非特异产物出现。

通过优化退火温度, IS1311-3 扩增鉴定 MA 标准菌株时, 在 30 个循环内出现扩增曲线; 同样条件下鉴定除 MA 之外相同浓度或更高浓度的 20 种 NTM 和 5 种常见致病菌时, 均未在 30 个循环前出现特异性扩增曲线, 同时在 30 个循环后出现特异性扩增曲线的样本无相应 T_m 值的熔解曲线。因此本研究选择在 30 个循环内出现特异性扩增曲线及在 87.5 °C 左右出现相应熔解峰的实验结果为最终判定标准, 建立鉴定 MA 的 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法。

建立的方法在包含 14 种分枝杆菌的 200 株临床分离株中鉴定出 MA 的比率与测序结果相比差异无统计学意义($P > 0.05$); 与测序结果的一致性较高, $Kappa$ 值 > 0.75 , $P < 0.01$ 。说明本研究中建立的 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法对 MA 具有较高的诊断准确性。本法敏感性为 93.8%, 特异性为 100%, 阳性预测值为 100%, 阴性预测值为 99.5%。与其他以 16S rDNA、hsp65、16S-23S rDNA 内转录间隔区为靶标鉴定临床分离株的结果(93.9%, 169/180)^[22]一致, 与基因芯片法特异性(98.9%)相似, 敏感性(80.0%)稍高^[23]。SYBR Green I 荧光

PCR 熔解曲线法以 DNA 为检测靶标, 更加稳定, 且 IS1311 在基因组中有 6~8 个转座酶基因拷贝^[24], 与 16S rDNA 在活菌内的拷贝数相当, 较高于 hsp65、rpoB 的拷贝数, 可提高检测的灵敏度, 具有检测临床样本中 MA 的潜力。

本研究也存在局限, 建立的 SYBR Green I 荧光 PCR 熔解曲线法在标准菌株中能很好地鉴定 MA, 但应用于临床菌株时, 未能将其完全检测出, 重复实验后发现该菌的扩增曲线始终在 30~32 循环之间, 将扩增产物进行 Sanger 双向测序后的序列与 U16276.1 比对为 100%。分析其原因可能与该菌和 MA 标准菌的 IS1311 拷贝数有差异, 导致其扩增循环数较大有关。因此, 在 30 个循环左右出现扩增曲线及在 87.5 °C 左右出现熔解峰的菌疑似 MA, 需进一步测序验证。此外, 目前建立的该方法仅初步用于临床菌株的鉴定, 下一步将继续完善, 从而能直接应用于临床样本的检测。因此, 未来需大样本临床检测, 来验证该方法的诊断准确性。

基于 SYBR Green I 建立的鉴定 MA 的荧光 PCR 熔解曲线法具有特异、敏感的优势, 且该技术操作简单, 对于缺乏经验的实验技术人员培训后即可开展实验, 更易于在临床中推广。

4 参考文献

- [1] Falkinham JO 3rd. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria[J]. Clin Chest Med, 2015, 36: 35-41.
- [2] Yu X, Liu P, Liu G, et al. The prevalence of non-tuberculous mycobacterial infections in mainland China: systematic review and meta-analysis[J]. J Infect, 2016, 73(6): 558-567.
- [3] 朱艳玲, 万康林, 沈国顺. 鸟分枝杆菌病[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(5): 507-511.
- [4] Yakus MA, Good RC. Geographic distribution, frequency, and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(5): 926-929.
- [5] Kim TS, Koh WJ, Han J. Hypothesis on the evolution of cavitary lesions in nontuberculous mycobacterial pulmonary infection: thin-section CT and histopathologic correlation[J]. Am J Roentgenol, 2005, 184(4): 1247-1252.
- [6] 王赛赛, 马艳, 刘洋. 脑脊液检测在结核性脑膜炎早期诊断中的研究进展[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(1): 95-101.
- [7] Chae H, Han SJ, Kim SY, et al. Development of a one-step multiplex PCR assay for differential detection of major *Mycobacterium* species[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(9): 2736-2751.
- [8] Bensi EP, Panunto PC, Ramos Mde C. Incidence of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria, differentiated by multiplex PCR, in clinical specimens of a large general hospital[J]. Clinics (Sao

- Paulo), 2013, 68(2): 179-184.
- [9] 贾彤, 张海晴, 魏素梅, 等. 2013~2017 年徐州市非结核分枝杆菌菌种鉴定、三间分布和耐药性分析[J]. 中国临床医生杂志, 2019, 47(2): 173-175.
- [10] 陈忠南, 易松林, 胡培磊, 等. 2012-2017 年湖南省非结核分枝杆菌感染的特征分析[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(2): 217-221.
- [11] 王培培, 刘焰, 罗凤玲, 等. 全细菌 SELEX 技术筛选鸟分枝杆菌的适配子[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(2): 113-117.
- [12] Torvinen E, Lehtola MJ, Martikainen PJ, et al. Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilms as affected by water flow velocity, availability of phosphorus, and temperature[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(19): 6201-6207.
- [13] 李晓杰, 吴勤学, 刘训荃. 鸟分枝杆菌聚合酶链反应检测的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(12): 679-681.
- [14] 李燕明, 佟训靓, 逢宇, 等. 鸟分枝杆菌复合群药物敏感性试验结果及临床特征分析[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(6): 622-627.
- [15] 张薇. 抗原 85B 特异性氨基酸序列质谱检测在鉴别诊断结核与非结核分枝杆菌感染中的价值[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2016: 1-79.
- [16] 黄海荣. 非结核分枝杆菌的菌种鉴定技术[J]. 中国医刊, 2016, 51(3): 10-13.
- [17] Shin SJ, Lee BS, Koh WJ, et al. Efficient differentiation of *Mycobacterium avium* complex species and subspecies by use of five-target multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 4057-4062.
- [18] de Albuquerque PPF, de Melo RPB, de Farias Brito Me, et al. First molecular epidemiological study of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cattle and buffalo from different regions of Brazil [J]. Trop Anim Health Prod, 2018, 50(8): 1929-1935.
- [19] Sonawane GG, Narnaware SD, Tripathi BN. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in ruminants in different parts of India [J]. Int J Mycobacteriol, 2016, 5(1): 59-65.
- [20] Bartos M, Hlozek P, Svastova P, et al. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards[J]. J Microbiol Meth, 2006, 64: 333-345.
- [21] Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, et al. Real time PCR detection chemistry[J]. Clin Chim Acta, 2015, 15(439): 231-250.
- [22] Kim JU, Cha CH, An HK. Multiplex real-time PCR assay and melting curve analysis for identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 483-487.
- [23] 史新辉, 王芳, 龙宇鹏, 等. 利用基因芯片法检测鸟分枝杆菌 [J]. 西南国防医药, 2014, 24(12): 1344-1346.
- [24] Dvorska L, Bartos M, Ostadal O, et al. IS1311 and IS1245 restriction fragment length polymorphism analyses, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium* complex isolates obtained from a human immunodeficiency virus-negative patient [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3712-3719.

(收稿日期:2020-01-10)

(本文编辑:刘群)