(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103038346 A
(43)申请公布日 2013.04.10

(21)申请号 201180036628.1

(22)申请日 2011.05.26

(30)优先权数据
10-2010-0049690 2010.05.27 KR
10-2010-0062845 2010.06.30 KR

(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.01.25

(86)PCT申请的申请数据
PCT/KR2011/003857 2011.05.26

(87)PCT申请的公布数据
WO2011/149279 KO 2011.12.01

(71)申请人 蔚山大学校产学协力团
地址 韩国蔚山广域市

(72)发明人 金廷昱

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 11290
代理人 张淑珍 王维玉

(51)Int.Cl.
C12N 15/11(2006.01)
C12Q 1/68(2006.01)
C12R 1/32(2006.01)

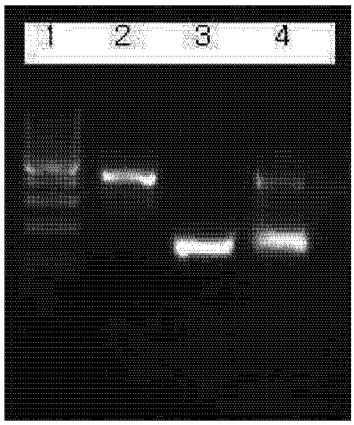
权利要求书 2 页 说明书 15 页
序列表 6 页 附图 1 页

(54)发明名称

使用双重聚合酶链式反应对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法

(57)摘要

本发明提供了通过双重聚合酶链式反应对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法，所述方法利用对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒，所述试剂盒包含对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的引物组，所述引物组对结核分枝杆菌特异性的IS6110基因或16s rRNA基因和非结核分枝杆菌特异性的16s rRNA基因具有特异性。本发明提供了使用便宜的常规PCR仪对结核分枝杆菌和/或非结核分枝杆菌同时进行更加有效的检测的临床诊断手段。



CN 103038346 A

1. 一种对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：

具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物；

选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物；

以及具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物。

2. 一种对结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列的反向引物。

3. 用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒，所述试剂盒包含：

对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ IDNO:2 的核苷酸序列的反向引物；以及

对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物。

4. 用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒，所述试剂盒包含：

对结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列的反向引物；以及

对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物。

5. 用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法，所述方法包含：

由测试对象中分离 DNA；

通过双重 PCR 使用如下引物组对所述 DNA 进行扩增：对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物；以及对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物；以及

对所述双重 PCR 的产物进行分析。

6. 用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法，所述方法包含：

由测试对象中分离 DNA；

通过双重 PCR 使用如下引物组对所述 DNA 进行扩增：对结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列的反向引物；以及对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物；以及

对所述双重 PCR 的产物进行分析。

7. 用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒，所述试剂盒包含：

对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物；以及

对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:12 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:13 的核苷酸序列的反向引物。

8. 用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法，所述方法包含：

由测试对象中分离 DNA；

通过双重 PCR 使用如下引物组对所述 DNA 进行扩增：对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物；以及对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:12 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:13 的核苷酸序列的反向引物；

以及对所述双重 PCR 的产物进行分析。

使用双重聚合酶链式反应对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)和非结核分枝杆菌(nontuberculous mycobacteria)的检测。更具体而言,本发明涉及能够对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的特异性核苷酸序列进行检测的引物组、包含所述引物组的用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒、以及使用所述引物组对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌同时进行检测的方法。

背景技术

[0002] 非结核分枝杆菌广泛分布于环境中,尤其是分布于湿土、沼泽地和河流中,并且在发现其机会致病特征(opportunistic character)前认为其是非致病菌。在 20 世纪 80 年代,发现非结核分枝杆菌为获得性免疫缺陷综合征(AIDS)患者中的肺病的机会致病菌。另外,还已知所述细菌导致其他患者中的疾病。随着对非结核分枝杆菌致病机制的报道,已逐渐认识到其临床意义。

[0003] 近年来,在结核病患病率低的美国和许多欧洲国家可见由非结核分枝杆菌引起的感染发病率的增高。韩国在结核病患病率方面已有所降低,但是在非结核分枝杆菌感染数方面相对增高。多亏韩国于 2009 年对进行结核病菌液体培养给予医疗保险的政策,设计用来进行液体培养的实验室数目增多。比起固体培养,更常用液体培养来对非结核分枝杆菌进行检测。报道显示,当通过液体培养进行测定时,在约 12% 的痰涂片阳性结核病病例中检测到了非结核分枝杆菌,而分离自痰中的非结核分枝杆菌占日本、香港和韩国的肺病病例的约 10 ～ 20%,占美国、加拿大和西欧的肺病病例的约 40 ～ 50%。

[0004] 由非结核分枝杆菌引起的肺病类似于结核病,发展缓慢,容于被误诊。然而,由于有效抑制结核分枝杆菌的药物不同于有效抑制非结核分枝杆菌的药物,因此需要快速且准确地分辨结核杆菌(tubercle bacilli)和非结核分枝杆菌,以便可以选择合适的药物。

[0005] 当前所使用的检测试剂并不仅是非结核分枝杆菌所固有的,而且还利用了结核分枝杆菌的核苷酸序列。传统试剂在检测和诊断的准确度方面有问题。例如,当仅存在一定浓度的结核分枝杆菌时,所述试剂不对用于检测结核分枝杆菌的引物起反应,而是仅对用于非结核分枝杆菌的引物起反应,以致错误地将非结核分枝杆菌鉴定为结核杆菌。另一方面,当非结核分枝杆菌与结核分枝杆菌同时存在时,只有非结核分枝杆菌可通过传统试剂加以检测。因此,需要能够识别在结核分枝杆菌中缺失、但在非结核分枝杆菌中固有的核苷酸序列的引物组,以及使用所述引物组快速且准确地分别对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的是提供对结核分枝杆菌所独有的 IS6110 或 16S rRNA 基因具有特异

性的引物组，以及对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，二者分别适用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行准确检测和诊断。

[0008] 本发明的另一目的是提供用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒，所述试剂盒包含对结核分枝杆菌所独有的 IS6110 或 16S rRNA 基因具有特异性的引物组以及对非结核分枝杆菌的16S rRNA基因具有特异性的引物组，二者分别适用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行准确检测和诊断。

[0009] 本发明的另一目的是提供使用双重聚合酶链式反应、基于所述引物组对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行准确检测和诊断的方法。

[0010] 技术方案

[0011] 根据本发明的一个方面，本发明提供了对非结核分枝杆菌的 16SrRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ IDNO:3 的核苷酸序列的正向引物；选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物；以及具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物。

[0012] 根据本发明的另一方面，本发明提供了对结核分枝杆菌的16S rRNA基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列的反向引物。

[0013] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒，所述试剂盒包含：对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物；以及对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物。

[0014] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒，所述试剂盒包含：对结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列的反向引物；以及对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物。

[0015] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法，所述方法包含：由测试对象中分离 DNA；通过双重 PCR 使用如下引物组对所述 DNA 进行扩增：对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物）和对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物）；以及对所述双重 PCR 的产物进行分析。

[0016] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进

行检测的方法，所述方法包含：由测试对象中分离 DNA；通过双重 PCR 使用如下引物组对所述 DNA 进行扩增：对结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列的反向引物）和对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物）；以及对所述双重 PCR 的产物进行分析。

[0017] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒，所述试剂盒包含：对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物；以及对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:12 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:13 的核苷酸序列的反向引物。

[0018] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法，所述方法包含：由测试对象中分离 DNA；通过双重 PCR 使用如下引物组对所述 DNA 进行扩增：对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物）和对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:12 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:13 的核苷酸序列的反向引物）；以及对所述双重 PCR 的产物进行分析。

[0019] 有益效果

[0020] 如上所述，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的引物组（所述引物组能够检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的特异性核苷酸序列）、使用所述引物组对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的检测试剂盒和基于双重 PCR 的方法。由于所述引物对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌来说是独有的，本发明的方法（能够使用便宜的常规 PCR 仪）可成为用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌同时进行检测的更高效的临床诊断手段。

附图说明

[0021] 图 1 为显示出使用实施例 1 的引物组进行双重 PCR 后的 DNA 片段的电泳照片。

[0022] 图 2 为显示出使用实施例 2 的引物组进行双重 PCR 后的 DNA 片段的电泳照片。

[0023] 图 3 为显示出使用实施例 3 的引物组进行双重 PCR 后的 DNA 片段的电泳照片。

具体实施方式

[0024] 根据本发明的一个方面，本发明提供了对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物。

[0025] SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的核苷酸序列（NTM-1）均为 16S rRNA

的特异性反向引物。SEQ ID NO:7 的核苷酸序列(NTM-2)也是非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物。非结核分枝杆菌 16S rRNA 基因的所有所述反向引物均被设计来检测所有的目标非结核分枝杆菌种。SEQ ID NO:7 (5'-catcccacaccgctaccw-3')的反向引物是指包含 5'-catcccacaccgctacct-3' (SEQ ID NO:8)和 5'-catcccacaccgctacca-3' (SEQ ID NO:9)的引物组。例如,SEQ ID NO:7 的核苷酸序列可为以约 1:1 的比例将 5'-catcccacaccgctacct-3'和 5'-catcccacaccgctacca-3'进行混合的引物组。

[0026] 根据本发明的另一方面,本发明提供了对结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组,所述引物组包含如下引物:具有 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列的反向引物。结核分枝杆菌 16S rRNA 基因的所述反向引物被设计来检测各种目标分枝杆菌种(结核分枝杆菌复合群,MTC)。

[0027] 根据本发明的又一方面,本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒,所述试剂盒包含:对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组,所述引物组包含如下引物:具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物;以及对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组,所述引物组包含如下引物:具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物。

[0028] 用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒包含对结核分枝杆菌的 IS6110 具有特异性的引物组,所述引物组包含如下引物:分别具有 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的正向引物和反向引物。IS6110 基因的所述特异性引物组被设计来检测各种目标分枝杆菌种(结核分枝杆菌复合群,MTC)。

[0029] 用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒包含对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组,所述引物组包含如下引物:具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列(NTM-1)所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列(NTM-2)的反向引物。非结核分枝杆菌 16S rRNA 基因的所述反向引物被设计来检测各种目标非结核分枝杆菌种。

[0030] 检测试剂盒可进一步包含通过 PCR 扩增 DNA 所必需的试剂。这一试剂可包括 DNA 聚合酶、dNTPs、PCR 缓冲液等。为了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒中,引物能够对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的特征基因进行检测,并可被设计使得能够产生在大小(bp)方面差异较大的 PCR 产物。

[0031] 在一个实施方式中,用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒可以 1:1 的比例包含具有 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物,后者以 1:1 的比例包含 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9。因此,在试剂盒中,SEQ ID NO:4 的引物、5'-catcccacaccgctacct-3' (SEQ ID NO:8)和 5'-catcccacaccgctacca-3' (SEQ ID NO:9)可按 2:1:1 的比例进行混合。

[0032] 在本发明的另一实施方式中,用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒可以 1:1 的比例包含具有 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物,后者以 1:1 的比例包含 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9。

[0033] 在本发明的另一实施方式中,用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的

试剂盒可以 1:1 的比例包含具有 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物，后者以 1:1 的比例包含 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9。

[0034] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒，所述试剂盒包含：对结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列的反向引物；以及对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物。

[0035] 检测试剂盒可进一步包含通过 PCR 扩增 DNA 所必需的试剂。这一试剂可包括 DNA 聚合酶、dNTPs、PCR 缓冲液等。为了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒中，引物能够对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的特征基因进行检测，并可被设计使得能够产生在大小（bp）方面差异较大的 PCR 产物。

[0036] 在一个实施方式中，用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒可以 1:1 的比例包含具有 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物，后者以 1:1 的比例包含 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9。

[0037] 在本发明的另一实施方式中，用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒可以 1:1 的比例包含具有 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物，后者以 1:1 的比例包含 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9。

[0038] 在本发明的另一实施方式中，用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒可以 1:1 的比例包含具有 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物，后者以 1:1 的比例包含 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9。

[0039] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法，所述方法包含：由测试对象中分离 DNA；通过双重 PCR 使用如下引物组对所述 DNA 进行扩增：对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物）和对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物）；以及对所述双重 PCR 的产物进行分析。

[0040] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法，所述方法包含：由测试对象中分离 DNA；通过双重 PCR 使用如下引物组对所述 DNA 进行扩增：对结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列的反向引物）和对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列的正向引物、选自于由 SEQ ID NO:4-6 的核苷酸序列所组成的组中的至少一个反向引物和具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列的反向引物）；以及对所述双重 PCR 的产物进行分析。

[0041] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进

行检测的试剂盒，所述试剂盒包含：对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物；以及对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:12 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:13 的核苷酸序列的反向引物。

[0042] 用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒包含对结核分枝杆菌 IS6110 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物。结核分枝杆菌 IS6110 基因的所述引物组被设计来检测各种目标分枝杆菌种（结核分枝杆菌复合群，MTC）。

[0043] 用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒包含对非结核分枝杆菌 16S rRNA 基因具有特异性的引物组，所述引物组包含如下引物：具有 SEQ ID NO:12 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:13 的核苷酸序列的反向引物。非结核分枝杆菌 16S rRNA 基因的所述正向引物被设计来检测各种目标非结核分枝杆菌种。

[0044] 检测试剂盒可进一步包含通过 PCR 扩增 DNA 所必需的试剂。这一试剂可包括 DNA 聚合酶、dNTPs、PCR 缓冲液等。为了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒中，引物能够对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的特征基因进行检测，并可被设计使得能够产生在大小（bp）方面差异较大的 PCR 产物。

[0045] 在根据本发明实施方式所述的用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的试剂盒中，具有 SEQ ID NO:12 的核苷酸序列的正向引物为比例为约 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1 的如下引物的组：5’-catgtcttgtgggggaaagctt-3’（SEQ ID NO:14）、5’-catgttttgtgggggaaagctt-3’（SEQ ID NO:15）、5’-catgtcttctgggggaaagctt-3’（SEQ ID NO:16）、5’-catgtcttgtggtggaaagctt-3’（SEQ ID NO:17）、5’-catgtcttgtggggcaaagctt-3’（SEQ ID NO:18）、5’-catgttttctgggggaaagctt-3’（SEQ ID NO:19）、5’-catgtcttctggtggaaagctt-3’（SEQ ID NO:20）、5’-catgtcttgtggtgcaaagctt-3’（SEQ ID NO:21）、5’-catgttttgtggggcaaagctt-3’（SEQ ID NO:22）、5’-catgtcttctggggcaaagctt-3’（SEQ ID NO:23）、5’-catgttttgtggtggaaagctt-3’（SEQ ID NO:24）、5’-catgttttctggtggaaagctt-3’（SEQ ID NO:25）、5’-catgttttctggggcaaagctt-3’（SEQ ID NO:26）、5’-catgttttgtggtgcaaagctt-3’（SEQ ID NO:27）、5’-catgtcttctggtgcaaagctt-3’（SEQ ID NO:28）和 5’-catgttttctggtgcaaagctt-3’（SEQ ID NO:29）。

[0046] 根据本发明的又一方面，本发明提供了用于对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法，所述方法包含：由测试对象中分离 DNA；通过双重 PCR 使用如下引物组对所述 DNA 进行扩增：对结核分枝杆菌的 IS6110 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的反向引物）和对非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因具有特异性的引物组（包含如下引物：具有 SEQ ID NO:12 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:13 的核苷酸序列的反向引物）；以及对所述双重 PCR 的产物进行分析。

[0047] 实施例

[0048] 通过下述实施例将更好地理解本发明，所述实施例用来对本发明进行说明，而不应被解释为对本发明进行限定。

[0049] 参考例：寻找结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的特征核苷酸序列

[0050] 1. 目标和基因位点

[0051] 将下列分枝杆菌的16S核糖体RNA基因数据用于寻找结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的特征核苷酸序列中：

[0052] 脓肿分枝杆菌(M.abscessus)(AJ419970.1、AJ416940.1、AJ536038)、阿加普尔分枝杆菌(M.acapulcensis)(AF480575.1)、非洲分枝杆菌(M.africanum)(AF480605.1)、田野分枝杆菌(M.agri)(AJ429045.1)、爱知分枝杆菌(M.aichiense)(X55598.1)、河床分枝杆菌(M.alvei)(NR_024859.1)、亚洲分枝杆菌(M.asiaticum)(X55604.1)、金色分枝杆菌(M.aurum)(FJ172298.1)、南非分枝杆菌(M.austroafricanum)(GU121552.1)、鸟分枝杆菌(M.avium)(NR_025584.1、AJ536037.1、EF521892.1)、波希米亚分枝杆菌(M.bohemicum)(NR_026054.1)、波特尼分枝杆菌(M.botniense)(NR_028878.1)、牛分枝杆菌(M.bovis)(GU142937.1)、布氏分枝杆菌(M.branderi)(AF480574.1)、雾分枝杆菌(M.brumae)(NR_025233.1)、隐藏分枝杆菌(M.celatum)(L08169.1)、龟分枝杆菌(M.chelonae)(AM884324.1、AJ419969.1)、千田分枝杆菌(M.chitae)(NR_029220.1)、氯酚分枝杆菌(M.chlorophenolicum)(NR_026173.1)、楚布分枝杆菌(M.chubuense)(X55596.1)、汇合分枝杆菌(M.confluentis)(AJ634379.1)、炫耀分枝杆菌(M.conspicuum)(X029298.1)、库氏分枝杆菌(M.cookii)(X53896.1)、迪氏分枝杆菌(M.diernhoferi)(AF480599.1)、M.doricum (NR_025099.1)、杜氏分枝杆菌(M.duvalii)(NR_026073.1)、M.engbaekii (AF480577.1)、诡诈分枝杆菌(M.fallax)(AF480600.1)、产鼻疽分枝杆菌(M.farcinogenes)(X55592.1)、转黄分枝杆菌(M.flavescens)(AY734993.1)、偶发分枝杆菌(M.forrtuitum)(AY457066.1、AF480580.1、GU142933.1)、加地斯分枝杆菌(M.gadium)(NR_026087.1)、胃分枝杆菌(M.gastri)(GU142918.1)、日内瓦分枝杆菌(M.genavense)(NR_029223.1)、浅黄分枝杆菌(M.gilvum)(AB491971.1)、戈地分枝杆菌(M.goodii)(AY457079.1)、戈氏分枝杆菌(M.gordonae)(GU142923.1)、嗜血分枝杆菌(M.haemophilum)(V06638.1)、M.hassiacum(NR_026011.1)、海德堡分枝杆菌(M.heidelbergense)(NR_025268.1)、爱尔兰分枝杆菌(M.hiberniae)(NR_026092.1)、霍德勤分枝杆菌(M.hodleri)(NR_026286.1)、免疫原分枝杆菌(M.immunogen)(AJ011771.1)、居间分枝杆菌(M..interjectum)(X70961.1)、中间分枝杆菌(M.intermedium)(X67847.1)、胞内分枝杆菌(M.intracellulare)(AY652958.1、AJ536036.1、X52927.1、M61684.1)、堪萨斯分枝杆菌(M.kansasii)(M29575.1、X15916.1)、缓黄分枝杆菌(M.lentiflavum)(AF480583.1)、M.mageritense (AY457076.1)、玛尔摩分枝杆菌(M.malmoense)(GQ153278.1)、海分枝杆菌(M.marinum)(AF456238.1、AY513243.1)、田鼠分枝杆菌(M.microti)(NR_025234.1)、M.monacense (GU142931.1)、莫里奥卡分枝杆菌(M.moriokaense)(AY859686.1)、产粘液分枝杆菌(M.mucogenicum)(AF480585.1)、新金色分枝杆菌(M.neoaurum)(FJ172306.1)、不产色分枝杆菌(M.nonchromogenicum)(DQ058406.1)、奥布分枝杆菌(M.obuense)(X55597.1)、石蜡分枝杆菌(M.paraffinicum)(GQ153282.1)、副偶然分枝杆菌(M.parafortuitum)(NR_026285.1)、外来分枝杆菌

(M.peregrinum)(AY457069.1)、草分枝杆菌(M.phlei)(AF480603.1)、猪分枝杆菌(M.porcinum)(AY457077.1)、海绵分枝杆菌(M.poriferae)(NR_025235.1)、灰尘分枝杆菌(M.pulveris)(NR025528.1)、罗得西亚分枝杆菌(M.rhodesiae)(NR_025529.1)、瘰疬分枝杆菌(M.scrofulaceum)(GQ153271.1)、M.senuense (DQ536409.1)、脓毒性分枝杆菌(M.septicum)(AY457070.1)、施氏分枝杆菌(M.shimoidei)(X82459.1)、猿分枝杆菌(M.simiae)(GQ153280.1)、耻垢分枝杆菌(M.smegmatis)(NR_025311.1)、泥炭藓分枝杆菌(M.sphagni)(X55590.1)、苏加分枝杆菌(M.szulgai)(X52926.1)、地分枝杆菌(M.terrae)(NR_029168.1)、耐热分枝杆菌(M.thermoresistibile)(GU142928.1)、M.tilburgii (AJ580826.1)、三重分枝杆菌(M.triplex)(GQ153279.1)、次要分枝杆菌(M.triviale)(DQ058405.1)、结核分枝杆菌(M.tuberculosis)(GU142936.1、GU142935.1、AY53603.1、X55588.1、X52917.1)、托斯卡分枝杆菌(M.tusciae)(NR_024903.1)、溃疡分枝杆菌(M.ulcerans)(Z13990.1)、母牛分枝杆菌(M.vaccae)(X55601.1)、沃林斯基分枝杆菌(M.wolinskyi)(AY457083.1)和蟾分枝杆菌(M.xenopi)(X52929.1)。从NCBI(美国国家生物技术信息中心)数据库中获得16S核糖体RNA基因的数据。

[0053] 通过Sequencher4.9对分枝杆菌种的16S rRNA基因序列的数据进行分析得到特征核苷酸序列,即,结核分枝杆菌复合群的特征核苷酸以及在结核分枝杆菌复合群中缺失、但在非结核分枝杆菌中固有的核苷酸。

[0054] 实施例1:结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌1的分离和检测

[0055] 1.检测目标和引物设计

[0056] 待检测的目标基因为结核分枝杆菌复合群的IS6110基因和非结核分枝杆菌的16S rRNA基因。

[0057] 将通用引物用作正向引物来扩增分枝杆菌的16S rRNA基因。将非结核分枝杆菌特征性的NTM-1和NTM-2用作反向引物。使用Primer3程序设计用于目标基因检测的这些引物。

[0058] (1)结核分枝杆菌复合群(MTC)

[0059] 1)目标基因:IS6110

[0060] 2)引物

[0061] a.正向引物:5'-cgaactcaaggagcacatca-3'(SEQ ID NO:1)

[0062] b.反向引物:5'-gtcgaggaccatggaggtg-3'(SEQ ID NO:2)

[0063] 3)PCR产物大小:385bp

[0064] (2)非结核分枝杆菌(NTM)

[0065] 1)目标基因:16S rRNA

[0066] 2)引物

[0067] a.正向引物:5'-gtggcgaacgggtgagtaa-3'(SEQ ID NO:3)

[0068] b.反向引物

[0069] NTM-1:5'-cccacaccgcaaaagctt-3'(SEQ ID NO:4)、5'-cccacaccgcaaaagct-3'(SEQ ID NO:5)或5'-tcccacaccgcaaaagct-3'(SEQID NO:6)

[0070] NTM-2:5'-catcccacaccgctaccw-3'(SEQ ID NO:7)

[0071] 3)PCR产物大小:128-135bp

[0072] <实施例 1-1：将 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列用作对 NTM 进行检测的反向引物 NTM-1 的双重 PCR>

[0073] (1)DNA 的分离

[0074] 使用自动化分枝杆菌生长系统 BACTEC MGIT960 (Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA)使结核分枝杆菌 ATCC25177 和脓肿分枝杆菌 ATCC19977 在特有的 MGIT 分枝杆菌生长培养基中生长。向 1.5mL 管中移入 500μL 培养有分枝杆菌的 MGIT 肉汤，并以 14,000rpm 离心 5min。去除上清液，将沉淀溶于 300μL 无菌蒸馏水中，并在沸水浴中加热 10min。在以 14,000rpm 离心 5min 后，将上清液用作 PCR 中的模板。将结核分枝杆菌 ATCC25177 和脓肿分枝杆菌 ATCC19977 的混合物用作组合的 MTC 和 NTM 种。

[0075] (2)双重 PCR

[0076] 使用 GeneAmp PCR 系统 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)，双重 PCR 从在约 94℃下预变性 2min 开始；再以如下条件运行 40 个循环：在约 94℃下变性 30 秒，在 56℃下退火 30 秒，以及在约 68℃下延伸 2min；接着在约 68℃下终延伸 3min。下表 1 中总结了所述双重 PCR 的组成。在引物混合物中，以相同的量(10pmole/μL)包含正向引物和反向引物。因此，对于 MTC，1.5μL 引物混合物包含含量各自为 15pmole 的正向引物和反向引物。由于 PCR 混合物的总体积为 25μL，所以其以 0.6μM (15pmole/25μL)的浓度含有引物。对于 NTM，正向引物和反向引物各自的含量为 10pmole/1μL，终浓度为 0.4μM (10pmole/25μL)。在这一背景下，当 NTM-2 反向引物由 5pmole 的 5'-catcccacaccgctacct-3'(SEQ ID NO:8)和 5pmole 的 5'-catcccacaccgctacca-3'(SEQ ID NO:9)组成时，NTM-1 反向引物(SEQID NO:4)和 NTM-2 反向引物(SEQ ID NO:7)各自以 10pmole 的量使用。

[0077] 表 1

[0078]

成分		体积 (μL)	浓度
10X PCR缓冲液		2.5	1X
dNTPs混合物 (各10 mM，Roche，Mannheim，Germany)		0.5	200 μM
引物混合物 (10 pmole/μL)	MTC	1.5	0.6 μM
	NTM	1.0	0.4 μM
Taq DNA聚合酶 (5单位/μL，Roche，Mannheim，Germany)		0.2	1单位
无核酸酶水		14.3	-
样品DNA模板		5	-
总计		25	-

[0079] <实施例 1-2. 将 SEQ ID NO:5 的核苷酸序列用作对 NTM 进行检测的反向引物 NTM-1 的双重 PCR>

[0080] 除将 SEQ ID NO:5 的核苷酸序列用作反向引物 NTM-1 外，以与实施例 1-1 中相同的方式进行双重 PCR。

[0081] <实施例 1-3. 将 SEQ ID NO:6 的核苷酸序列用作对 NTM 进行检测的反向引物 NTM-1 的双重 PCR>

[0082] 除将 SEQ ID NO:6 的核苷酸序列用作反向引物 NTM-1 外，以与实施例 1-1 中相同的方式进行双重 PCR。

[0083] 2. 双重 PCR 的结果

[0084] 将 5μL 双重 PCR 产物和 1μL 凝胶加样缓冲液的混合物加样至含 1μg/mL 溴化乙锭(EtBr)的 2% 琼脂糖凝胶，并在 157 伏特下电泳 25min。使用装有 UV 透射仪的图像分析仪(Bio-Rad，USA)拍摄电泳图。分子量大小标准为 GeneRuler100bp DNA Ladder。

[0085] 图 1 为显示出使用实施例 1 的引物组进行双重 PCR 后的 DNA 片段的电泳照片。在图 1 中，分子量大小标准和来自 MTC、NTM 以及 MTC+NTM 组合的 DNA 分别跑在第 1 道、第 2 道、第 3 道和第 4 道中。

[0086] 如图 1 所示，双重 PCR 扩增了特征目标基因，所述目标基因可从如下条带看出：第 2 道中约 385bp 处的单一条带，第 3 道中约 128bp 处的单一条带和第 4 道中约 385bp 和约 128bp 处的双条带。

[0087] 因此，发现使用 MTC 和 NTM 特征核苷酸序列的特异性引物的双重 PCR 确保了同时以高可靠性对标准种(standard species)的 MTC 和 NTM 进行检测。

[0088] 实施例 2：结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌 2 的分离和检测

[0089] 1. 检测目标和引物设计

[0090] 待检测的目标基因为结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因。使用 Primer3 程序设计用于目标基因检测的引物。

[0091] (1)结核分枝杆菌复合群(MTC)

[0092] 1)目标基因：16S rRNA

[0093] 2)引物

[0094] a. 正向引物：5’-gtcttgtggtggaaagcgc-3’(SEQ ID NO:10)

[0095] b. 反向引物：5’-agagaacccggaccttcgt-3’(SEQ ID NO:11)

[0096] 3)PCR 产物大小：272bp

[0097] (2)非结核分枝杆菌(NTM)

[0098] 1)目标基因：16S rRNA

[0099] 2)引物

[0100] a. 正向引物：5’-gtggcgaacgggtgagtaa-3’(SEQ ID NO:3)

[0101] b. 反向引物

[0102] NTM-1：5’-cccacaccgcaaaagctt-3’(SEQ ID NO:4)、5’-cccacaccgcaaaagct-3’(SEQ ID NO:5)或 5’-tcccacaccgcaaaagct-3’(SEQ ID NO:6)

[0103] NTM-2：5’-catcccacaccgctaccw-3’(SEQ ID NO:7)

[0104] 3)PCR 产物大小：128-135bp

[0105] <实施例 2-1. 将 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列用作对 NTM 进行检测的反向引物 NTM-1 的双重 PCR>

[0106] (1)DNA 的分离

[0107] 使用自动化分枝杆菌生长系统 BACTEC MGIT960 (Becton，Dickinson and Company，Maryland，USA)使结核分枝杆菌 ATCC25177 和脓肿分枝杆菌 ATCC19977 在特有的 MGIT 分枝杆菌生长培养基中生长。向 1.5mL 管中移入 500μL 培养有分枝杆菌的 MGIT 肉

汤，并以 14,000rpm 离心 5min。去除上清液，将沉淀溶于 300μL 无菌蒸馏水中，并在沸水浴中加热 10min。在以 14,000rpm 离心 5min 后，将上清液用作 PCR 中的模板。将结核分枝杆菌 ATCC25177 和脓肿分枝杆菌 ATCC19977 的混合物用作组合的 MTC 和 NTM 种。

[0108] （2）双重 PCR

[0109] 使用 GeneAmp PCR 系统 9700（Applied Biosystems，Foster City，CA，USA），双重 PCR 从在约 94℃下预变性 2min 开始；再以如下条件运行 40 个循环：在约 94℃下变性 30 秒，在 56℃下退火 30 秒，以及在约 68℃下延伸 2min；接着在约 68℃下终延伸 3min。下表 2 中总结了所述双重 PCR 的组成。在引物混合物中，以相同的量（10pmole/μL）包含正向引物和反向引物。因此，对于 MTC，1.5μL 引物混合物包含含量各自为 15pmole 的正向引物和反向引物。由于 PCR 混合物的总体积为 25μL，所以其以 0.6μM（15pmole/25μL）的浓度含有引物。对于 NTM，正向引物和反向引物各自的含量为 10pmole/1μL，终浓度为 0.4μM（10pmole/25μL）。在这一背景下，当 NTM-2 反向引物由 5pmole 的 5'-catcccacaccgctacct-3'（SEQ ID NO:8）和 5pmole 的 5'-catcccacaccgctacca-3'（SEQ ID NO:9）组成时，NTM-1 反向引物（SEQID NO:4）和 NTM-2 反向引物（SEQ ID NO:7）各自以 10pmole 的量使用。

[0110] 表 2

[0111]

成分		体积（μL）	浓度
10X PCR 缓冲液		2.5	1X
dNTPs 混合物（各 10 mM，Roche，Mannheim，Germany）		0.5	200 μM
引物混合物（10 pmole/μL）	MTC	1.5	0.6 μM
	NTM	1.0	0.4 μM
Taq DNA聚合酶（5 单位/μL，Roche，Mannheim，Germany）		0.2	1 单位
无核酸酶水		14.3	-
样品 DNA 模板		5	-
总计		25	-

[0112] <实施例 2-2. 将 SEQ ID NO:5 的核苷酸序列用作对 NTM 进行检测的反向引物 NTM-1 的双重 PCR>

[0113] 除将 SEQ ID NO:5 的核苷酸序列用作反向引物 NTM-1 外，以与实施例 2-1 中相同的方式进行双重 PCR。

[0114] <实施例 2-3. 将 SEQ ID NO:6 的核苷酸序列用作对 NTM 进行检测的反向引物 NTM-1 的双重 PCR>

[0115] 除将 SEQ ID NO:6 的核苷酸序列用作反向引物 NTM-1 外，以与实施例 2-1 中相同的方式进行双重 PCR。

[0116] 2. 双重 PCR 的结果

[0117] 将 5μL 双重 PCR 产物和 1μL 凝胶加样缓冲液的混合物加样至含 1μg/mL 溴化乙锭（EtBr）的 2% 琼脂糖凝胶，并在 157 伏特下电泳 25min。使用装有 UV 透射仪的图像分析仪（Bio-Rad，USA）拍摄电泳图。分子量大小标准为 GeneRuler100bp DNA Ladder。

[0118] 图 2 为显示出使用实施例 2 的引物组进行双重 PCR 后的 DNA 片段的电泳照片。在图 2 中，分子量大小标准和来自 MTC、NTM 以及 MTC+NTM 组合的 DNA 分别跑在第 1 道、第 2 道、第 3 道和第 4 道中。

[0119] 如图 2 所示，双重 PCR 扩增了特征目标基因，所述目标基因可从如下条带看出：第 2 道中约 272bp 处的单一条带，第 3 道中约 128bp 处的单一条带和第 4 道中约 128bp 和约 272bp 处的双条带。

[0120] 因此，发现使用 MTC 和 NTM 特征核苷酸序列的特异性引物的双重 PCR 确保了同时以高可靠性对标准种的 MTC 和 NTM 进行检测。

[0121] 实施例 3：结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌 3 的分离和检测

[0122] 1. 检测目标和引物设计

[0123] 待检测的目标基因为结核分枝杆菌复合群的 IS6110 基因和非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因。为了用于对非结核分枝杆菌进行检测，当将通用引物用作反向引物时，正向引物对非结核分枝杆菌的特征目标基因具有特异性。使用 Primer3 程序设计用于目标基因检测的这些引物。

[0124] (1) 结核分枝杆菌复合群(MTC)

[0125] 1) 目标基因：IS6110

[0126] 2) 引物

[0127] a. 正向引物：5’-cgaactcaaggagcacatca-3’(SEQ ID NO:1)

[0128] b. 反向引物：5’-gtcgaggaccatggaggtg-3’(SEQ ID NO:2)

[0129] 3) PCR 产物大小：385bp

[0130] (2) 非结核分枝杆菌(NTM)

[0131] 1) 目标基因：16S rRNA

[0132] 2) 引物

[0133] a. 正向引物：5’-catgtyttstggkgsaaagctt-3’(SEQ ID NO:12)

[0134] b. 反向引物：5’-cgtaggagtctgggccgta-3’(SEQ ID NO:13)

[0135] 3) PCR 产物大小：152bp

[0136] 2. 双重 PCR

[0137] (1) DNA 的分离

[0138] 使用 4 株标准种结核分枝杆菌 ATCC25177、田鼠分枝杆菌 ATCC19422、脓肿分枝杆菌 ATCC19977 和嗜血分枝杆菌 ATCC29548，以及在临床受试者中鉴定出的分枝杆菌种和非结核分枝杆菌种。使用自动化分枝杆菌生长系统 BACTEC MGIT960(Becton,Dickinson and Company，Maryland，USA) 使这些菌在特有的 MGIT 分枝杆菌生长培养基中生长。向 1.5mL 管中移入 500μL 培养有分枝杆菌的 MGIT 肉汤，并以 14,000rpm 离心 5min。去除上清液，将沉淀溶于 300μL 无菌蒸馏水中，并在沸水浴中加热 10min。在以 14,000rpm 离心 5min 后，将上清液用作 PCR 中的模板。

[0139] (2) 双重 PCR

[0140] 使用 GeneAmp PCR 系统 9700 (Applied Biosystems，Foster City，CA，USA)，双重 PCR 从在约 94℃下预变性 2min 开始；再以如下条件运行 40 个循环：在约 94℃下变性 30 秒，在 52℃下退火 30 秒，以及在约 65℃下延伸 2min；接着在约 65℃下终延伸 3min。下表 3

中总结了所述双重 PCR 的组成。在引物混合物中，以相同的量（10pmole/μL）包含正向引物和反向引物。因此，对于 MTC，1.25μL 引物混合物包含含量各自为 12.5pmole 的正向引物和反向引物。由于 PCR 混合物的总体积为 25μL，所以其以 0.5μM（12.5pmole/25μL）的浓度含有引物。对于 NTM，正向引物和反向引物各自的含量为 15pmole/1.5μL，终浓度为 0.6μM（15pmole/25μL）。在这一背景下，NTM 正向引物由如下引物以约 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1 的比例组成：5'-catgtcttgtgggggaaagctt-3'（SEQ ID NO:14）、5'-catgttttgtgggggaaagctt-3'（SEQ ID NO:15）、5'-catgtcttctgggggaaagctt-3'（SEQ ID NO:16）、5'-catgtcttgtggtggaaagctt-3'（SEQ ID NO:17）、5'-catgtcttgtggggcaaagctt-3'（SEQ ID NO:18）、5'-catgttttctgggggaaagctt-3'（SEQ ID NO:19）、5'-catgtcttctggtggaaagctt-3'（SEQ ID NO:20）、5'-catgtcttgtggtgcaaagctt-3'（SEQ ID NO:21）、5'-catgttttgtggggcaaagctt-3'（SEQ ID NO:22）、5'-catgtcttctggggcaaagctt-3'（SEQ ID NO:23）、5'-catgttttgtggtggaaagctt-3'（SEQ ID NO:24）、5'-catgttttctggtggaaagctt-3'（SEQ ID NO:25）、5'-catgttttctggggcaaagctt-3'（SEQ ID NO:26）、5'-catgttttgtggtgcaaagctt-3'（SEQ ID NO:27）、5'-catgtcttctggtgcaaagctt-3'（SEQ ID NO:28）和 5'-catgttttctggtgcaaagctt-3'（SEQ ID NO:29）。

[0141] 表 3

[0142]

成分		体积（μL）	浓度
10X PCR 缓冲液		2.5	1X
dNTPs 混合物（各 10 mM，Roche，Mannheim，Germany）		0.5	200 μM
引物混合物（10 pmole/μL）	MTC	1.25	0.5 μM
	NTM	1.5	0.6 μM
Taq DNA聚合酶（5 单位/μL，Roche，Mannheim，Germany）		0.2	1 单位
无核酸酶水		14.05	-
样品 DNA 模板		5	-
总计		25	-

[0143] 3. 双重 PCR 的结果

[0144] 将 5μL 双重 PCR 产物和 1μL 凝胶加样缓冲液的混合物加样至含 1μg/mL 溴化乙锭（EtBr）的 2% 琼脂糖凝胶，并在 157 伏特下电泳 25min。使用装有 UV 透射仪的图像分析仪（Bio-Rad，USA）拍摄电泳图。分子量大小标准为 GeneRuler100bp DNA Ladder。

[0145] 图 3 为显示出使用实施例 3 的引物组进行双重 PCR 后的 DNA 片段的电泳照片。在图 3 中，分子量大小标准和来自 NTM（嗜血分枝杆菌）、分枝杆菌（MTC，田鼠分枝杆菌）、临床受试者（MTC+NTM）、NTM（脓肿分枝杆菌）以及 MTC（结核分枝杆菌）的 DNA 分别跑在第 1-6 道中。

[0146] 如图 3 所示，双重 PCR 扩增了特征目标基因，所述目标基因可从如下条带看出：第 3 道和第 6 道中约 385bp 处的单一条带，第 2 道和第 5 道中约 152bp 处的单一条带以及第 4

道中约 152bp 和约 385bp 处的双条带。

[0147] 因此，发现使用 MTC 和 NTM 特征核苷酸序列的特异性引物的双重 PCR 确保了同时以高可靠性对标准种的 MTC 和 NTM 进行检测。

[0148] 如实施例所证实的，双重PCR与检测试剂盒相结合可用于以高可靠度对MTC和NTM进行检测，所述试剂盒包含基于 MTC 的特征核苷酸序列或 MTC 缺失但 NTM 所固有的核苷酸序列设计的正向引物和反向引物。因此，本发明提供了有效地对 MTC 和 NTM 进行检测的手段。

[0149] 如上所述，当将本发明的引物组(能够检测出 MTC 和 NTM 的特征核苷酸序列)用于检测时，所述引物组对 MTC 和 NTM 具有高灵敏度和高选择性。此外，使用本发明引物的双重 PCR 为确保对目标受试者中的 MTC 和 NTM 非常高效且同时进行检测的临床诊断手段。

[0150] 工业实用性

[0151] 如本文所述，可将用于对 MTC 和 NTM 的特征基因进行检测的本发明的引物组、检测试剂盒和检测方法用作 MTC 和 NTM 所引起的疾病的临床诊断，由此发现了在包括医院、研究所等的医学领域中的用途。

[0152] 序列表文本

[0153] SEQ ID NO:1 的核苷酸序列为结核分枝杆菌复合群的 IS6110 基因的特异性正向引物；

[0154] SEQ ID NO:2 的核苷酸序列为结核分枝杆菌复合群的 IS6110 基因的特异性反向引物；

[0155] SEQ ID NO:3 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0156] SEQ ID NO:4 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物(NTM-1)；

[0157] SEQ ID NO:5 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物(NTM-1)；

[0158] SEQ ID NO:6 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物(NTM-1)；

[0159] SEQ ID NO:7 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物(NTM-2)；

[0160] SEQ ID NO:8 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物(NTM-2)；

[0161] SEQ ID NO:9 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物(NTM-2)。

[0162] SEQ ID NO:10 的核苷酸序列为结核分枝杆菌复合群的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0163] SEQ ID NO:11 的核苷酸序列为结核分枝杆菌复合群的 16S rRNA 基因的特异性反向引物；

[0164] SEQ ID NO:12 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0165] SEQ ID NO:13 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物；

[0166] SEQ ID NO:14 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0167] SEQ ID NO:15 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0168] SEQ ID NO:16 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0169] SEQ ID NO:17 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0170] SEQ ID NO:18 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0171] SEQ ID NO:19 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0172] SEQ ID NO:20 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0173] SEQ ID NO:21 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0174] SEQ ID NO:22 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0175] SEQ ID NO:23 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0176] SEQ ID NO:24 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0177] SEQ ID NO:25 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0178] SEQ ID NO:26 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0179] SEQ ID NO:27 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0180] SEQ ID NO:28 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物；

[0181] SEQ ID NO:29 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物。

[0001]

<110> UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION

<120> 使用双重聚合酶链式反应对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法

<130> op-2011-0023pct

<150> KR 10-2010-0049690
<151> 2010-05-27

<150> KR 10 2010 0062845
<151> 2010-06-30

<160> 29

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增结核分枝杆菌复合群的IS6110基因的特异性片段的正向引物

<400> 1
cgaactcaag gagcacatca 20

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增结核分枝杆菌复合群的IS6110基因的特异性片段的反向引物

<400> 2
gtcgaggacc atggaggtg 19

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 3
gtggcgaacg ggtgagtaa 19

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的反向引物(NTM-1)

<400> 4
cccacaccgc aaaagctt 18

<210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的反向引物(NTM-1)

<400> 5
cccacaccgc aaaagct 17

[0002]

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的反向引物(NTM-1)

<400> 6
tcccacaccg caaaagct 18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的反向引物(NTM-2)

<400> 7
catcccacac cgctaccw 18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的反向引物(NTM-2)

<400> 8
catcccacac cgctacct 18

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的反向引物(NTM-2)

<400> 9
catcccacac cgctacca 18

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增结核分枝杆菌复合群的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 10
gtcttgtggt ggaaagcgc 19

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增结核分枝杆菌复合群的16S rRNA基因的特异性片段的反向引物

<400> 11

[0003]

agagaacccg gaccttcgt 19

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 12
catgtyttst ggkgsaaagc tt 22

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的反向引物

<400> 13
cgtaggagtc tgggccgta 19

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 14
catgtcttgt gggggaaagc tt 22

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 15
catgttttgt gggggaaagc tt 22

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 16
catgtcttct gggggaaagc tt 22

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

[0004]

<400> 17
catgtcttgt ggtggaaagc tt 22

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 18
catgtcttgt ggggcaaagc tt 22

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 19
catgttttct gggggaaagc tt 22

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 20
catgtcttct ggtggaaagc tt 22

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 21
catgtcttgt ggtgcaaagc tt 22

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 22
catgttttgt ggggcaaagc tt 22

<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0005]

<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 23
catgtcttct ggggcaaagc tt 22

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 24
catgttttgt ggtggaaagc tt 22

<210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 25
catgttttct ggtggaaagc tt 22

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 26
catgttttct ggggcaaagc tt 22

<210> 27
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 27
catgttttgt ggtgcaaagc tt 22

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 28
catgtcttct ggtgcaaagc tt 22

<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

[0006]

<220>
<223> 用于扩增非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性片段的正向引物

<400> 29
catgttttct ggtgcaaagc tt 22



图 1

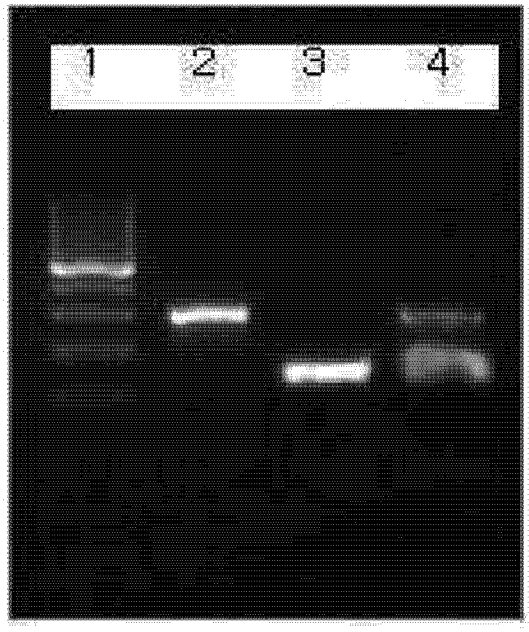


图 2

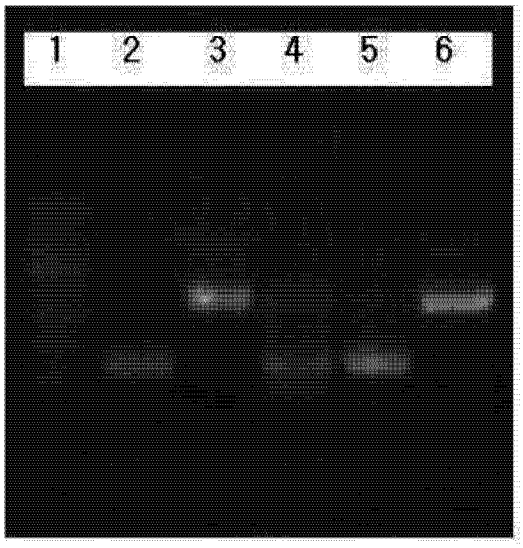


图 3