



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103038347 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 10

(21) 申请号 201180036722. 7

(22) 申请日 2011. 05. 26

(30) 优先权数据

10-2010-0049691 2010. 05. 27 KR

10-2010-0062846 2010. 06. 30 KR

10-2011-0009529 2011. 01. 31 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/KR2011/003858 2011. 05. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02011/149280 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 20 页

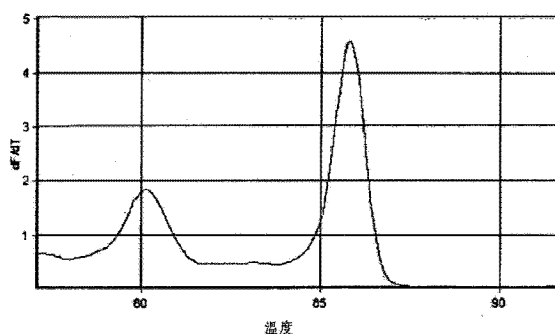
序列表 8 页 附图 5 页

(54) 发明名称

使用双重实时聚合酶链式反应和解链曲线分析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

本发明提供了对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的引物,所述引物分别对结核分枝杆菌特异性的 IS6110 基因和非结核分枝杆菌特异性的 16S rRNA 基因具有特异性;包含所述引物的结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的检测试剂盒;以及通过使用所述引物的双重实时聚合酶链式反应和通过解链曲线分析检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的方法。因为本发明不使用序列特异性探针,本发明可提供低成本地对结核分枝杆菌和/或非结核分枝杆菌同时且更有效地进行快速检测的临床诊断手段。



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. 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。

3. 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;

通过双重实时 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;

将所扩增的 DNA 产物加热至不同温度,以产生解链曲线;以及

对所述解链曲线进行分析,以确定目标 DNA 的解链温度。

4. 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:20 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:21 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:18 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:19 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:20 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的反向引物。

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;

通过双重实时 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:18 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:19 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:20 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的反向引物;

将所扩增的 DNA 产物加热至不同温度,以产生解链曲线;以及
对所述解链曲线进行分析,以确定目标 DNA 的解链温度。

7. 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:

由具有 SEQ ID NO:38-40 的核苷酸序列的各引物组成的正向引物;以及
具有 SEQ ID NO:21 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:18 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:19 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:
由具有 SEQ ID NO:38-40 的核苷酸序列的各引物组成的正向引物;以及具有 SEQ ID NO:21
的核苷酸序列的反向引物。

9. 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;

通过双重实时 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:18 的核苷酸序列的正
向引物和具有 SEQ ID NO:19 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:由具有 SEQ ID NO:38-40 的核苷酸序
列的各引物组成的正向引物以及具有 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的反向引物;

将所扩增的 DNA 产物加热至不同温度,以产生解链曲线;以及
对所述解链曲线进行分析,以确定目标 DNA 的解链温度。

使用双重实时聚合酶链式反应和解链曲线分析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通过双重实时 PCR 和解链曲线分析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,在结核病患者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。韩国在结核病患者率方面已有所降低,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,容易被误诊。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 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 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的方法,所述方法使用基于所述引物组的双重实时聚合酶链式反应及解链曲线。

[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 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。

[0012] 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。

[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方法,所述方法包含:由测试对象中分离 DNA;通过双重实时 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);将所扩增的 DNA 产物加热至不同温度,以产生解链曲线;以及对所述解链曲线进行分析,以确定目标 DNA 的解链温度。

[0014] 根据本发明的另一方面,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:20 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:21 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:18 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:19 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:20 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的反向引物。

[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;通过双重实时 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:18 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:19 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:20 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的反向引物);将所扩增的 DNA 产物加热至不同温度,以产生解链曲线;以及对所述解链曲线进行分析,以确定目标 DNA 的解链温度。

[0017] 根据本发明的又一方面,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:由具有 SEQ ID NO:38-40 的核苷酸序列的各引物组成的正向引物;以及具有 SEQ ID NO:21 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:18 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:19 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:由具有 SEQ ID NO:38-40 的核苷酸序列的各引物组成的正向引物以及具有 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的反向引物。

[0019] 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;通过双重实时 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:18 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:19 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:由具有 SEQ ID NO:38-40 的核苷酸序列的各引物组成的正向引物以及具有 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的反向引物);将所扩增的 DNA 产物加热至不同温度,以产生解链曲线;以及对所述解链曲线进行分析,以确定目标 DNA 的解链温度。

[0020] 有益效果

[0021] 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征核苷酸序列)、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实时 PCR 的方法。因为不采用特异性探针,本发明的方法可成为用于低成本地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

[0022] 图 1 为根据实施例 1 针对 MTC 进行双重实时 PCR 而获得的扩增子的解链曲线。

[0023] 图 2 为根据实施例 1 针对 NTM 进行双重实时 PCR 而获得的扩增子的解链曲线。

[0024] 图 3 为根据实施例 1 针对 MTC+NTM 进行双重实时 PCR 而获得的扩增子的解链曲线。

[0025] 图 4 为根据实施例 2 针对 MTC 进行双重实时 PCR 而获得的扩增子的解链曲线。

[0026] 图 5 为根据实施例 2 针对 NTM 进行双重实时 PCR 而获得的扩增子的解链曲线。

[0027] 图 6 为根据实施例 2 针对 MTC+NTM 进行双重实时 PCR 而获得的扩增子的解链曲线。

[0028] 图 7 为根据实施例 3 针对 MTC 进行双重实时 PCR 而获得的扩增子的解链曲线。

[0029] 图 8 为根据实施例 3 针对 NTM 进行双重实时 PCR 而获得的扩增子的解链曲线。

[0030] 图 9 为根据实施例 3 针对 MTC+NTM 进行双重实时 PCR 而获得的扩增子的解链曲线。

具体实施方式

[0031] 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。

[0032] SEQ ID NO3 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 的特异性正向引物。SEQ ID NO:3 的核苷酸序列(5'-gggrayctgccctgcac-3')是指包含如下引物的引物组:5'-ggtaatctgccctgcac-3'(SEQ ID NO:8)、5'-ggtaacctgccctgcac-3'(SEQ ID NO:9)、5'-ggcaatctgccctgcac-3'(SEQ ID NO:10)、5'-ggcaacctgccctgcac-3'(SEQ ID NO:11)、5'-ggtgatctgccctgcac-3'(SEQ ID NO:12)、5'-ggtgacctgccctgcac-3'(SEQ ID NO:13)、5'-ggcgatctgccctgcac-3'(SEQ ID NO:14) 和 5'-ggcgacctgccctgcac-3'(SEQ ID NO:15)。例如,所述引物组可为将如下引物以约 1:1:1:1:1:1:1 的比例混合的引物组:5'-ggtaatctgccctgcac-3'、5'-ggtaacctgccctgcac-3'、5'-ggcaatctgccctgcac-3'、5'-ggcaacctgccctgcac-3'、5'-ggtgatctgccctgcac-3'、5'-ggtgacctgccctgcac-3'、5'-ggcgatctgccctgcac-3' 和 5'-ggcgacctgccctgcac-3'。

[0033] 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'-catccacacccgctaccw-3')的反向引物是指包含 5'-catccacacccgctacct-3'(SEQ ID NO:16) 和 5'-catccacacccgctacca-3'(SEQ ID NO:17) 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'-catccacacccgctacct-3' 和 5'-catccacacccgctacca-3' 进行混合的引物组。

[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 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。

[0035] 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)。

[0036] 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。

[0037] 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:16 和 SEQ ID NO:17。因此,在试剂盒中,SEQ ID NO:4 的引物、5'-catccacacaccgctacct-3' (SEQ ID NO:16) 和 5'-catccacacaccgctacca-3' (SEQ ID NO:17) 可按 2:1:1 的比例进行混合。

[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: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:16 和 SEQ ID NO:17。

[0039] 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:16 和 SEQ ID NO:17。

[0040] 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解链温度方面差异很大的 PCR 产物。因为 PCR 产物的解链曲线因多种因素 (包括 DNA 大小和 GC 比) 而异,可在引物组的设计中兼顾这些因素。

[0041] 根据本发明的一个实施方式,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进一步包含荧光染料,如 SYTO9、EvaGreen 或 LCGreen,但不包含 SYBR Green,因为当以高浓度使用这种荧光染料时,它不仅抑制聚合酶链式反应,还在产物解链的过程中重新分布,对高分辨率解链曲线产生负面影响,所述高分辨率解链曲线可以帮助确定基因型。即,用于 PCR 和解链曲线分析的反应混合物可包含荧光染料,如 SYTO9、EvaGreen 或 LCGreen。例如,PCR 和解链曲线分析可使用含有 EvaGreen 的反应混合物。在一个实施方式中,借助 Type-it HRM PCR 试剂盒 (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA) 完成实时 PCR。这一试剂盒含有 EvaGreen。

[0042] 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;通过双重实时 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);将所扩增的 DNA 产物加热至不同温度,以产生解链曲线;以及对所述解链曲线进行分析,以确定目标 DNA 的解链温度。

[0043] 在本发明的一个实施方式中,可通过测量 510nm 处的吸光度进行解链曲线的分析。

[0044] 根据本发明的另一方面,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 ID NO:20 的核苷酸序列的正向引物和

具有 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的反向引物。

[0045] SEQ ID NO:20 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 的特异性正向引物。非结核分枝杆菌的 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。SEQ ID NO:20 的核苷酸序列是指包含比例为约 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1 的如下引物的引物组:5'-catgtcttgtgggggaaagctt-3' (SEQ ID NO:22)、5'-catgttttgtgggggaaagctt-3' (SEQ ID NO:23)、5'-catgtcttctgggggaaagctt-3' (SEQ ID NO:24)、5'-catgtcttgtggtggaaagctt-3' (SEQ ID NO:25)、5'-catgtcttgtggggcaaagctt-3' (SEQ ID NO:26)、5'-catgttttctgggggaaagctt-3' (SEQ ID NO:27)、5'-catgtcttctggtggaaagctt-3' (SEQ ID NO:28)、5'-catgtcttgtggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:29)、5'-catgttttgtggggcaaagctt-3' (SEQ ID NO:30)、5'-catgtcttctggtggcaaagctt-3' (SEQ ID NO:31)、5'-catgttttgtggtggaaagctt-3' (SEQ ID NO:32)、5'-catgttttctggtggaaagctt-3' (SEQ ID NO:33)、5'-catgttttctggtggcaaagctt-3' (SEQ ID NO:34)、5'-catgttttgtggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:35)、5'-catgtcttctggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:36) 和 5'-catgttttctggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:37)。

[0046] SEQ ID NO:21 的核苷酸序列用作非结核分枝杆菌的 16S rRNA 的特异性反向引物。

[0047] 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:18 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:19 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:20 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的反向引物。

[0048] 在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,结核分枝杆菌的 IS6110 基因的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),所述引物组包含如下引物:具有 SEQ ID NO:18 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:19 的核苷酸序列的反向引物。

[0049] 在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,非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性引物组被设计来检测各种目标非结核分枝杆菌,所述引物组包含如下引物:分别具有 SEQ ID NO:20 和 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的正向引物和反向引物。

[0050] 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解链温度方面差异很大的 PCR 产物。因为 PCR 产物的解链曲线因多种因素(包括 DNA 大小和 GC 比)而异,可在引物组的设计中兼顾这些因素。

[0051] 根据本发明的一个实施方式,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进一步包含荧光染料,如 SYTO9、EvaGreen 或 LCGreen,但不包含 SYBR Green,因为当以高浓度使用这种荧光染料时,它不仅抑制聚合酶链式反应,还在产物解链的过程中重新分布,对高分辨率解链曲线产生负面影响,所述高分辨率解链曲线可以帮助确定基因型。即,用于 PCR 和解链曲线分析的反应混合物可包含荧光染料,如 SYTO9、EvaGreen 或

LCGreen。例如,PCR和解链曲线分析可使用含有EvaGreen的反应混合物。在一个实施方式中,借助Type-it HRM PCR试剂盒(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)完成实时PCR。这一试剂盒含有EvaGreen。

[0052] 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;通过双重实时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:18的核苷酸序列的正向引物和具有SEQ ID NO:19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:20的核苷酸序列的正向引物和具有SEQ ID NO:21的核苷酸序列的反向引物);将所扩增的DNA产物加热至不同温度,以产生解链曲线;以及对所述解链曲线进行分析,以确定目标DNA的解链温度。

[0053] 根据本发明的又一方面,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:由具有SEQ ID NO:38-40的核苷酸序列的各引物组成的正向引物;以及具有SEQ ID NO:21的核苷酸序列的反向引物。

[0054] SEQ ID NO:38 (NTM-1)、SEQ ID NO:39 (NTM-2)和SEQ ID NO:40 (NTM-3)的核苷酸序列均为非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性正向引物。非结核分枝杆菌的16S rRNA的所述特异性正向引物被设计来检测各种非结核分枝杆菌。

[0055] 所述正向引物可形成以约1:1的比例将5'-tgtggtggaaagcttttgc-3' (SEQ ID NO:41)和5'-tttggtggaaagcttttgc-3' (SEQ ID NO:42)混合的引物组。

[0056] 或者,所述正向引物可形成包含比例为约1:1的5'-ggtgagtgggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:43)和5'-gggtgtgtgggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:44)的引物组。

[0057] SEQ ID NO:21的核苷酸序列用作非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性反向引物。

[0058] 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:18的核苷酸序列的正向引物和具有SEQ ID NO:19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:由具有SEQ ID NO:38-40的核苷酸序列的各引物组成的正向引物以及具有SEQ ID NO:21的核苷酸序列的反向引物。

[0059] 在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,结核分枝杆菌的IS6110基因的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),所述引物组包含如下引物:具有SEQ ID NO:18的核苷酸序列的正向引物和具有SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物。

[0060] 在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,非结核分枝杆菌的16S rRNA基因的特异性引物组被设计来检测各种目标非结核分枝杆菌,所述引物组包含如下引物:由具有SEQ ID NO:38-40的核苷酸序列的各引物组成的正向引物;以及具有SEQ ID NO:21的核苷酸序列的反向引物。

[0061] 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解链温度方面差异很大的 PCR 产物。因为 PCR 产物的解链曲线因多种因素(包括 DNA 大小和 GC 比)而异,可在引物组的设计中兼顾这些因素。

[0062] 根据本发明的一个实施方式,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进一步包含荧光染料,如 SYTO9、EvaGreen 或 LCGreen,但不包含 SYBR Green,因为当以高浓度使用这种荧光染料时,它不仅抑制聚合酶链式反应,还在产物解链的过程中重新分布,对高分辨率解链曲线产生负面影响,所述高分辨率解链曲线可以帮助确定基因型。即,用于 PCR 和解链曲线分析的反应混合物可包含荧光染料,如 SYTO9、EvaGreen 或 LCGreen。例如,PCR 和解链曲线分析可使用含有 EvaGreen 的反应混合物。在一个实施方式中,借助 Type-it HRM PCR 试剂盒(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)完成实时 PCR。这一试剂盒含有 EvaGreen。

[0063] 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;通过双重实时 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:18 的核苷酸序列的正向引物和具有 SEQ ID NO:19 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:由具有 SEQ ID NO:38-40 的核苷酸序列的各引物组成的正向引物;以及具有 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列的反向引物);将所扩增的 DNA 产物加热至不同温度,以产生解链曲线;以及对所述解链曲线进行分析,以确定目标 DNA 的解链温度。

[0064] 根据本发明的一个实施方式,可通过测量 510nm 处的吸光度进行解链曲线的分析。

[0065] 实施例

[0066] 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。

[0067] 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

[0068] 1. 目标和基因位点

[0069] 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:

[0070] 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. fortuitum*) (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*) (NR_025528.1)、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。

[0071] 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。

[0072] 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

[0073] 1. 检测目标和引物设计

[0074] 待通过 PCR 和解链曲线分析进行检测的目标基因为结核分枝杆菌复合群(结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌)的 IS6110 基因和非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因。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。

[0075] (1) 结核分枝杆菌复合群(MTC)

[0076] 1) 目标基因:IS6110

[0077] 2) 引物

[0078] a. 正向引物:5'-cgaactcaaggagcacatca-3' (SEQ ID NO:1)

[0079] b. 反向引物:5'-agtttggtcatcagccgttc-3' (SEQ ID NO:2)

[0080] 3) PCR 产物大小:135bp

[0081] 4) PCR 产物的平均解链温度(T_m):约 $86.18 \pm 0.16^\circ\text{C}$ (各批次的 T_m 稍有不同)

[0082] (2) 非结核分枝杆菌(NTM)

[0083] 1) 目标基因:16S rRNA

[0084] 2) 引物

[0085] a. 正向引物:5'-ggyrayctgccctgcac-3' (SEQ ID NO:3)

[0086] b. 反向引物

[0087] NTM-1:5'-cccacaccgcaaaagctt-3' (SEQ ID NO:4)、5'-cccacaccgcaaaagct-3' (SEQ ID NO:5) 或 5'-tcccacaccgcaaaagct-3' (SEQ ID NO:6)

[0088] NTM-2:5'-catcccacaccgctaccw-3' (SEQ ID NO:7)

[0089] 3) PCR 产物大小:104bp

[0090] 4) PCR 产物的平均解链温度(T_m):约 80.10°C - 82.10°C (T_m 因非结核分枝杆菌种的不同而不同,但是均在约 80°C - 82°C 的范围内)。

[0091] < 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 的双重实时 PCR 和解链曲线分析 >

[0092] (1) DNA 的分离

[0093] DNA 分离自 186 个分枝杆菌种和 78 个非结核分枝杆菌种(均为在临床受试者中鉴定的),以及 7 个标准 ATCC 分枝杆菌种(包括结核分枝杆菌(ATCC 25177)、胞内分枝杆菌(ATCC 13950)、瘰癧分枝杆菌(ATCC19981)、堪萨斯分枝杆菌(ATCC 12478)、偶发分枝杆菌(ATCC 6841)、脓肿分枝杆菌(ATCC 19977)和鸟分枝杆菌(ATCC 25291))。

[0094] 将在临床受试者中鉴定的种(包括 186 个分枝杆菌种和 78 个非结核分枝杆菌种)在液体培养基(MGIT 分枝杆菌培养基)或固体培养基(Ogawa 培养基)中进行检测,或者直接从痰样本中分离。将 ATCC 标准种在肉汤中培养。

[0095] 依照如下方式,从在肉汤中培养的分枝杆菌中分离 DNA。向 1.5mL 管中移入 500 μL 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 300 μL 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。

[0096] 依照如下方式,从在琼脂平板上培养的分枝杆菌中分离 DNA。用白金环(platinum loop)从琼脂平板上取样并溶于 1.5mL 管中的 500 μ L 无菌蒸馏水中,并在沸水浴中加热 10min。接着以 14,000rpm 离心 5min。将上清液用作 PCR 中的模板。

[0097] 依照如下方式处理痰样本。向 15mL 管或 50mL 管中的痰中加入 1 体积的 1N NaOH,然后静置 10min 以使痰液化。接着以 14,000rpm 离心 2min 后,在 1mL 无菌蒸馏水中将沉淀充分混匀 10 秒。再次将混合物以 14,000rpm 离心 2min,并在 1mL 无菌蒸馏水中将沉淀充分混匀 10 秒。以 14,000rpm 离心 2min,并将沉淀与 100 μ L 的 5%chelex 树脂(BioRad, USA)和 1 μ L 的 10mg/mL 蛋白酶 K 充分混匀。在 56 $^{\circ}$ C 静置 15min 后,将混合物在沸水浴中加热 10min。以 14,000rpm 离心 5min 后,取上清液用作 PCR 中的模板。

[0098] (2) 双重 PCR 和解链曲线分析

[0099] 使用 Type-it HRM PCR 试剂盒(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA) 在 Rotor-Gene6000 (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA) 上进行,双重实时 PCR 从在约 95 $^{\circ}$ C 下变性 5min 开始;再以如下条件运行 40 个循环:在约 95 $^{\circ}$ C 下变性 10 秒,在 60 $^{\circ}$ C 下退火 30 秒并延伸。这一试剂盒含有荧光染料 EvaGreen。PCR 完成后,在以 0.2 $^{\circ}$ C / 秒的升温速度将 PCR 产物从约 77 $^{\circ}$ C 加热至约 91.5 $^{\circ}$ C 的同时,通过测量 510nm 处的吸光度进行解链曲线分析。因为 PCR 取决于各种因素(包括引物的浓度以及退火和延伸步骤的温度和时间),综合考虑所述因素来确定对两种目标基因进行检测的最优 PCR 条件。下表 1 总结了所述双重实时 PCR 的组成。

[0100] 在引物混合物中,以相同的量(10pmole/ μ L)包含正向引物和反向引物。因此,对于 MTC,1.75 μ L 引物混合物包含含量各自为 17.5pmole 的正向引物和反向引物。由于 PCR 混合物的总体积为 25 μ L,所以其以 0.7 μ M(17.5pmole/25 μ L)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/1 μ L,终浓度为 0.4 μ M(10pmole/25 μ L)。在这一背景下,NTM 正向引物为如下引物的组:5'-ggtaatctgccctgcac-3' (SEQ ID NO:8)、5'-ggtaacctgccctgcac-3' (SEQ ID NO:9)、5'-ggcaatctgccctgcac-3' (SEQ ID NO:10)、5'-ggcaacctgccctgcac-3' (SEQ ID NO:11)、5'-ggtgatctgccctgcac-3' (SEQ ID NO:12)、5'-ggtgacctgccctgcac-3' (SEQ ID NO:13)、5'-ggcgatctgccctgcac-3' (SEQ ID NO:14)和 5'-ggcgacctgccctgcac-3' (SEQ ID NO:15)。在所述引物组中,SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15 的引物以约 1:1:1:1:1:1:1:1 的比例使用。即,所述引物组含有含量各自为 1.25pmole 的如下引物:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15。另一方面,当 NTM-2 反向引物由 5pmole 的 5'-catccacacccgctacct-3' (SEQ ID NO:16) 和 5pmole 的 5'-catccacacccgctacca-3' (SEQ ID NO:17) 组成时,NTM-1 反向引物(SEQ ID NO:4)和 NTM-2 反向引物(SEQ ID NO:7)各自以 10pmole 的量使用。

[0101] 表 1

[0102]	成分		体积 (μL)	浓度
	2X HRM PCR Master Mix		12.5	1X
	引物混合物 (10 pmole/μL)	MTC	1.75	0.7 μM
		NTM	1.0	0.4 μM
	无核酸酶水		4.75	-
	样品 DNA 模板		5	-
	总计		25	-

[0103] < 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 的双重实时 PCR 和解链曲线分析 >

[0104] 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实时 PCR 和解链曲线分析。

[0105] < 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 的双重实时 PCR 和解链曲线分析 >

[0106] 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实时 PCR 和解链曲线分析。

[0107] 2. 双重实时 PCR 和解链曲线分析的结果

[0108] 图 1- 图 3 为从所述菌(分别为 MTC、NTM 和 MTC+NTM)的 DNA 中扩增的双重实时 PCR 产物(扩增子)的解链曲线。在所述曲线中, 温度(°C)设置在 X- 轴上, 而 Y- 轴上设置的为每单位时间荧光强度(F)的变化(dF/dT)。

[0109] 测得 MTC 扩增子的平均解链温度(T_m)为约 $86.18 \pm 0.16^\circ\text{C}$, 而 NTM 扩增子的 T_m 范围为约 80.10°C - 82.10°C 。对于 MTC+NTM, 读出了两个单独的 T_m 峰。

[0110] 因此, 发现本发明的双重实时 PCR 和解链曲线分析确保了同时以高可靠性对临床受试者中的 MTC 和 NTM 进行检测。

[0111] 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

[0112] 1. 检测目标和引物设计

[0113] 待通过 PCR 和解链曲线分析进行检测的目标基因为结核分枝杆菌复合群(结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌)的 IS6110 基因和非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因。用于对非结核分枝杆菌进行检测的正向引物对非结核分枝杆菌的特征目标基因具有特异性, 而将通用引物用作反向引物。使用 Primer3 程序设计用于目标基因检测的这些引物。

[0114] (1) 结核分枝杆菌复合群(MTC)

[0115] 1) 目标基因: IS6110

[0116] 2) 引物

[0117] a. 正向引物: 5'-agaaggcgctactcgacctga-3' (SEQ ID NO:18)

[0118] b. 反向引物: 5'-ctgaaccggatcgatgtgta-3' (SEQ ID NO:19)

[0119] 3) PCR 产物大小: 75bp

[0120] 4) PCR 产物的平均解链温度(T_m): $78.0 \pm 0.20^\circ\text{C}$

[0121] (2) 非结核分枝杆菌(NTM)

[0122] 1) 目标基因: 16S rRNA

[0123] 2) 引物

[0124] a. 正向引物: 5'-catgtyttstggkgsaaagctt-3' (SEQ ID NO:20)

[0125] b. 反向引物: 5'-cgtaggagctctgggccgta-3' (SEQ ID NO:21)

[0126] 3) PCR 产物大小: 152bp

[0127] 4) PCR 产物的平均解链温度 (T_m): 约 86.7°C -88.24°C (T_m 因非结核分枝杆菌种的不同而不同, 但是均在约 86.5°C -88.5°C 的范围内)。

[0128] 2. 双重 PCR 和解链曲线分析

[0129] (1) DNA 的分离

[0130] DNA 分离自 186 个分枝杆菌种和 78 个非结核分枝杆菌种 (均为在临床受试者中鉴定的), 以及 68 个标准 ATCC 分枝杆菌种 (包括脓肿分枝杆菌 ATCC19977、阿加普尔分枝杆菌 KCTC9501、非洲分枝杆菌 ATCC25420、田野分枝杆菌 KCTC9502、河床分枝杆菌 KCTC19709、亚洲分枝杆菌 KCTC9503、金色分枝杆菌 KCTC19457、南非分枝杆菌 KCTC9504、鸟分枝杆菌 ATCC25291、博氏分枝杆菌 (*M. boletii*) KCTC19281、波特尼分枝杆菌 KCTC19646、牛分枝杆菌 ATCC19210、雾分枝杆菌 KCTC19711、隐藏分枝杆菌 ATCC51131、龟分枝杆菌龟型亚种 (*M. chelonae* subsp. *chelonae*) KCTC9505、氯酚分枝杆菌 KCTC19089、楚布分枝杆菌 KCTC19712、迪氏分枝杆菌 KCTC9506、诡诈分枝杆菌 KCTC9508、转黄分枝杆菌 ATCC14474、偶发分枝杆菌 ATCC6841、腓特烈斯堡分枝杆菌 (*M. frederiksbergense*) KCTC19100、加地斯分枝杆菌 ATCC27726、胃分枝杆菌 ATCC15754、浅黄分枝杆菌 KCTC19423、戈地分枝杆菌 ATCCBAA-955、戈氏分枝杆菌 KCTC9513、嗜血分枝杆菌 ATCC29548、*M. hassiacum* ATCC700660、居间分枝杆菌 ATCC51457、中间分枝杆菌 ATCC51848、胞内分枝杆菌 ATCC13950、胞内分枝杆菌 KCTC9514、堪萨斯分枝杆菌 ATCC12478、缓黄分枝杆菌 KMRC70087、玛尔摩分枝杆菌 ATCC29571、*M. mantobense* KCTC9977、海分枝杆菌 ATCC927、马赛分枝杆菌 (*M. massiliense*) KCTC19086、田鼠分枝杆菌 ATCC19422、莫里奥卡分枝杆菌 KCTC9516、产粘液分枝杆菌 KCTC19088、新金色分枝杆菌 KCTC19096、不产色分枝杆菌 ATCC19530、奥布分枝杆菌 KCTC19097、副癰疽分枝杆菌 (*M. parascrofulaceum*) KCTC9979、外来分枝杆菌 KCTC9615、KMRC75002、草分枝杆菌 KCTC9689、猪分枝杆菌 KCTC9517、灰尘分枝杆菌 KCTC9518、癰疽分枝杆菌 ATCC19981、脓毒性分枝杆菌 ATCC700731、猿分枝杆菌 ATCC25275、施氏分枝杆菌 ATCC27962、耻垢分枝杆菌 KCTC9108、苏加分枝杆菌 KCTC9520、KMRC31125、地分枝杆菌 KCTC9614、三重分枝杆菌 ATCC700071、次要分枝杆菌 KMRC70093、结核分枝杆菌 ATCC25177、ATCC27294、溃疡分枝杆菌 ATCC19423、母牛分枝杆菌 KCTC19087、*M. vanbaalenii* KCTC9966、沃林斯基分枝杆菌 ATCC700010 和蟾分枝杆菌 KMRC42001)。

[0131] 将在临床受试者中鉴定的种 (包括 186 个分枝杆菌种和 78 个非结核分枝杆菌种) 在液体培养基 (MGIT 分枝杆菌培养基) 或固体培养基 (Ogawa 培养基) 中进行检测, 或者直接从痰样本中分离。ATCC 和 KCTC 标准种在肉汤中培养, 而 KMRC 种在琼脂平板上生长。

[0132] 依照如下方式, 从在肉汤中培养的分枝杆菌中分离 DNA。向 1.5mL 管中移入 500 μ L 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 300 μ L 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。

[0133] 依照如下方式, 从在琼脂平板上培养的分枝杆菌中分离 DNA。用白金环从琼脂平

板上取样并溶于 1.5mL 管中的 500 μ L 无菌蒸馏水中,并在沸水浴中加热 10min。接着以 14,000rpm 离心 5min。将上清液用作 PCR 中的模板。

[0134] 依照如下方式处理痰样本。向 15mL 管或 50mL 管中的痰中加入 1 体积的 1N NaOH,然后静置 10min 以使痰液化。接着以 14,000rpm 离心 2min 后,在 1mL 无菌蒸馏水中将沉淀充分混匀 10 秒。再次将混合物以 14,000rpm 离心 2min,并在 1mL 无菌蒸馏水中将沉淀充分混匀 10 秒。以 14,000rpm 离心 2min,并将沉淀与 100 μ L 的 5%chelex 树脂(BioRad, USA)和 1 μ L 的 10mg/mL 蛋白酶 K 充分混匀。在 56℃静置 15min 后,将混合物在沸水浴中加热 10min。以 14,000rpm 离心 5min 后,取上清液用作 PCR 中的模板。

[0135] (2) 双重 PCR 和解链曲线分析

[0136] 使用 Type-it HRM PCR 试剂盒(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)在 Rotor-Gene Q (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA) 上进行,双重实时 PCR 从在约 95℃下变性 5min 开始;再以如下条件运行 40 个循环:在约 95℃下变性 10 秒,在 50℃下退火 30 秒,以及在 63℃下延伸 5 秒。这一试剂盒含有荧光染料 EvaGreen。PCR 完成后,在以 0.2℃/秒的升温速度将 PCR 产物从约 75℃加热到约 93.5℃的同时,通过测量 510nm 处的吸光度进行解链曲线分析。因为 PCR 取决于各种因素(包括引物的浓度以及退火和延伸步骤的温度和时间),综合考虑所述因素来确定对两种目标基因进行检测的最优 PCR 条件。下表 2 总结了所述双重实时 PCR 的组成。

[0137] 在引物混合物中,以相同的量(10pmole/ μ L)包含正向引物和反向引物。因此,对于 MTC,1.25 μ L 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 25 μ L,所以其以 0.5 μ M(12.5pmole/25 μ L)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/1.5 μ L,终浓度为 0.6 μ M (15pmole/25 μ L)。在这一背景下,NTM 正向引物为如下引物以约 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1 的比例进行混合的组:5'-catgtcttgtgggggaaagctt-3' (SEQ ID NO:22)、5'-catgttttgtgggggaaagctt-3' (SEQ ID NO:23)、5'-catgtcttctgggggaaagctt-3' (SEQ ID NO:24)、5'-catgtcttgtggtggaaagctt-3' (SEQ ID NO:25)、5'-catgtcttgtggggcaaagctt-3' (SEQ ID NO:26)、5'-catgttttctgggggaaagctt-3' (SEQ ID NO:27)、5'-catgtcttctggtggaaagctt-3' (SEQ ID NO:28)、5'-catgtcttgtggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:29)、5'-catgttttgtggggcaaagctt-3' (SEQ ID NO:30)、5'-catgtcttctggggcaaagctt-3' (SEQ ID NO:31)、5'-catgttttgtggtggaaagctt-3' (SEQ ID NO:32)、5'-catgttttctggtggaaagctt-3' (SEQ ID NO:33)、5'-catgttttctggggcaaagctt-3' (SEQ ID NO:34)、5'-catgttttgtggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:35)、5'-catgtcttctggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:36)和 5'-catgttttctggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:37)。

[0138] 表 2

[0139]

成分	体积 (μL)	浓度
2X HRM PCR Master Mix	12.5	1X
引物混合物 (10 pmole/μL)	MTC	0.5 μM
	NTM	0.6 μM
无核酸酶水	4.75	-
样品 DNA 模板	5	-
总计	25	-

[0140] 3. 双重实时 PCR 和解链曲线分析的结果

[0141] 图 4- 图 6 为从所述菌(分别为 MTC、NTM 和 MTC+NTM)的 DNA 中扩增的双重实时 PCR 产物(扩增子)的解链曲线。在所述曲线中,温度(°C)设置在 X- 轴上,而 Y- 轴上设置的为每单位时间荧光强度(F)的变化(dF/dT)。

[0142] 测得 MTC 扩增子的平均解链温度(T_m)为约 $78.0 \pm 0.20^\circ\text{C}$,而 NTM 扩增子的 T_m 范围为约 86.5°C - 88.5°C 。对于 MTC+NTM,读出了两个单独的 T_m 峰。

[0143] 因此,发现本发明的双重实时 PCR 和解链曲线分析确保了同时以高可靠性对临床受试者中的 MTC 和 NTM 进行检测。

[0144] 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

[0145] 1. 检测目标和引物设计

[0146] 待通过 PCR 和解链曲线分析进行检测的目标基因为结核分枝杆菌复合群(结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌)的 IS6110 基因和非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因。用于对非结核分枝杆菌进行检测的正向引物对非结核分枝杆菌的特征目标基因具有特异性,而将通用引物用作反向引物。使用 Primer3 程序设计用于目标基因检测的这些引物。

[0147] (1) 结核分枝杆菌复合群(MTC)

[0148] 1) 目标基因 :IS6110

[0149] 2) 引物

[0150] a. 正向引物 :5' -agaaggcgactcgacctga-3' (SEQ ID NO:18)

[0151] b. 反向引物 :5' -ctgaaccggatcgatgtgta-3' (SEQ ID NO:19)

[0152] 3) PCR 产物大小 :75bp

[0153] 4) PCR 产物的平均解链温度(T_m) : $78.0 \pm 0.20^\circ\text{C}$

[0154] (2) 非结核分枝杆菌(NTM)

[0155] 1) 目标基因 :16S rRNA

[0156] 2) 引物

[0157] a. 正向引物

[0158] NTM-1 :5' -tktggtggaaagcttttgc-3' (SEQ ID NO:38)

[0159] NTM-2 :5' -ggtgwtggtgcaaagctt-3' (SEQ ID NO:39)

[0160] NTM-3 :5' -tggtggaaagcggtttggt-3' (SEQ ID NO:40)

[0161] b. 反向引物 :5' -cgtaggagctctgggccgta-3' (SEQ ID NO:21)

[0162] 3) PCR 产物大小 :152bp

[0163] 4) PCR 产物的平均解链温度(T_m) : $86.6 \pm 0.26^\circ\text{C}$

[0164] 2. 双重 PCR 和解链曲线分析

[0165] (1) DNA 的分离

[0166] DNA 分离自 186 个分枝杆菌种和 78 个非结核分枝杆菌种(均为在临床受试者中鉴定的),以及 68 个标准 ATCC 分枝杆菌种(包括脓肿分枝杆菌 ATCC19977、阿加普尔分枝杆菌 KCTC9501、非洲分枝杆菌 ATCC25420、田野分枝杆菌 KCTC9502、河床分枝杆菌 KCTC19709、亚洲分枝杆菌 KCTC9503、金色分枝杆菌 KCTC19457、南非分枝杆菌 KCTC9504、鸟分枝杆菌 ATCC25291、博氏分枝杆菌 KCTC19281、波特尼分枝杆菌 KCTC19646、牛分枝杆菌 ATCC19210、雾分枝杆菌 KCTC19711、隐藏分枝杆菌 ATCC51131、龟分枝杆菌龟型亚种 KCTC9505、氯酚分枝杆菌 KCTC19089、楚布分枝杆菌 KCTC19712、迪氏分枝杆菌 KCTC9506、诡诈分枝杆菌 KCTC9508、转黄分枝杆菌 ATCC14474、偶发分枝杆菌 ATCC6841、腓特烈斯堡分枝杆菌 KCTC19100、加地斯分枝杆菌 ATCC27726、胃分枝杆菌 ATCC15754、浅黄分枝杆菌 KCTC19423、戈地分枝杆菌 ATCC BAA-955、戈氏分枝杆菌 KCTC9513、嗜血分枝杆菌 ATCC29548、*M. hassiacum* ATCC700660、居间分枝杆菌 ATCC51457、中间分枝杆菌 ATCC51848、胞内分枝杆菌 ATCC13950、胞内分枝杆菌 KCTC9514、堪萨斯分枝杆菌 ATCC12478、缓黄分枝杆菌 KMRC70087、玛尔摩分枝杆菌 ATCC29571、*M. mantobense* KCTC9977、海分枝杆菌 ATCC927、马赛分枝杆菌 KCTC19086、田鼠分枝杆菌 ATCC19422、莫里奥卡分枝杆菌 KCTC9516、产粘液分枝杆菌 KCTC19088、新金色分枝杆菌 KCTC19096、不产色分枝杆菌 ATCC19530、奥布分枝杆菌 KCTC19097、副癰癆分枝杆菌 KCTC9979、外来分枝杆菌 KCTC9615、KMRC75002、草分枝杆菌 KCTC9689、猪分枝杆菌 KCTC9517、灰尘分枝杆菌 KCTC9518、癰癆分枝杆菌 ATCC19981、脓毒性分枝杆菌 ATCC700731、猿分枝杆菌 ATCC25275、施氏分枝杆菌 ATCC27962、耻垢分枝杆菌 KCTC9108、苏加分枝杆菌 KCTC9520、KMRC31125、地分枝杆菌 KCTC9614、三重分枝杆菌 ATCC700071、次要分枝杆菌 KMRC70093、结核分枝杆菌 ATCC25177、ATCC27294、溃疡分枝杆菌 ATCC19423、母牛分枝杆菌 KCTC19087、*M. vanbaalenii* KCTC9966、沃林斯基分枝杆菌 ATCC700010 和蟾分枝杆菌 KMRC42001)。

[0167] 将在临床受试者中鉴定的种(包括 186 个分枝杆菌种和 78 个非结核分枝杆菌种)在液体培养基(MGIT 分枝杆菌培养基)或固体培养基(Ogawa 培养基)中进行检测,或者直接从痰样本中分离。ATCC 和 KCTC 标准种在肉汤中培养,而 KMRC 种在琼脂平板上生长。

[0168] 依照如下方式,从在肉汤中培养的分枝杆菌中分离 DNA。向 1.5mL 管中移入 500 μ L 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 300 μ L 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。

[0169] 依照如下方式,从在琼脂平板上培养的分枝杆菌中分离 DNA。用白金环从琼脂平板上取样并溶于 1.5mL 管中的 500 μ L 无菌蒸馏水中,并在沸水浴中加热 10min。接着以 14,000rpm 离心 5min。将上清液用作 PCR 中的模板。

[0170] 依照如下方式处理痰样本。向 15mL 管或 50mL 管中的痰中加入 1 体积的 1N NaOH,然后静置 10min 以使痰液化。接着以 14,000rpm 离心 2min 后,在 1mL 无菌蒸馏水中将沉淀充分混匀 10 秒。再次将混合物以 14,000rpm 离心 2min,并在 1mL 无菌蒸馏水中将沉淀充分混匀 10 秒。以 14,000rpm 离心 2min,并将沉淀与 100 μ L 的 5%chelex 树脂(BioRad, USA)和 1 μ L 的 10mg/mL 蛋白酶 K 充分混匀。在 56 $^{\circ}$ C 静置 15min 后,将混合物在沸水浴中加热

10min。以 14,000rpm 离心 5min 后,取上清液用作 PCR 中的模板。

[0171] (2) 双重 PCR 和解链曲线分析

[0172] 使用 Type-it HRM PCR 试剂盒(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)在 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)上进行,双重实时 PCR 从在约 95℃下变性 5min 开始;再以如下条件运行 40 个循环:在约 95℃下变性 10 秒,在 61℃下退火并延伸 30 秒。这一试剂盒含有荧光染料 EvaGreen。PCR 完成后,在以 0.2℃/秒的升温速度将 PCR 产物从约 72℃加热至约 93℃的同时,通过测量 510nm 处的吸光度进行解链曲线分析。因为 PCR 取决于各种因素(包括引物的浓度以及退火和延伸步骤的温度和时间),综合考虑所述因素来确定对两种目标基因进行检测的最优 PCR 条件。下表 3 总结了所述双重实时 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,1.875 μL 引物混合物包含含量各自为 18.75pmole 的正向引物和反向引物。由于 PCR 混合物的总体积为 25 μL,所以其以 0.75 μM (18.75pmole/25 μL)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 12.5pmole/1.25 μL,终浓度为 0.5 μM (12.5pmole/25 μL)。在这一背景下,NTM-1 正向引物(SEQ ID NO:38)、NTM-2 正向引物(SEQ ID NO:39)和 NTM-3 正向引物(SEQ ID NO:40)以基本上相同的量使用。在 NTM-1 正向引物(SEQ ID NO:38)中,5'-tgtggtggaaagcttttgc-3'(SEQ ID NO:41)和 5'-tttggtggaaagcttttgc-3'(SEQ ID NO:42)以约 1:1 的比例存在,而 NTM-2 正向引物(SEQ ID NO:39)包含比例为约 1:1 的 5'-ggtgagtgtgtgcaaagctt-3'(SEQ ID NO:43)和 5'-ggtgtgtgtgtgcaaagctt-3'(SEQ ID NO:44)。

[0173] 表 3

成分		体积 (μL)	浓度
2X HRM PCR Master Mix		12.5	1X
引物混合物 (10 pmole/μL)	MTC	1.875	0.75 μM
	NTM	1.25	0.5 μM
无核酸酶水		4.375	-
样品 DNA 模板		5	-
总计		25	-

[0175] 3. 双重实时 PCR 和解链曲线分析的结果

[0176] 图 7- 图 9 为从所述菌(分别为 MTC、NTM 和 MTC+NTM)的 DNA 中扩增的双重实时 PCR 产物(扩增子)的解链曲线。在所述曲线中,温度(℃)设置在 X- 轴上,而 Y- 轴上设置的为每单位时间荧光强度(F)的变化(dF/dT)。

[0177] 测得 MTC 扩增子的平均解链温度(T_m)为约 78.0±0.20℃,而 NTM 扩增子的 T_m 为约 86.6±0.26℃。对于 MTC+NTM,读出了两个单独的 T_m 峰。

[0178] 因此,发现本发明的双重实时 PCR 和解链曲线分析确保了同时以高可靠性对临床受试者中的 MTC 和 NTM 进行检测。

[0179] 如实施例所证实的,双重 PCR 和解链曲线分析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。

[0180] 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 和本发明的解链曲线分析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。

[0181] 工业实用性

[0182] 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。

[0183] 序列表文本

[0184] SEQ ID NO:1 的核苷酸序列为结核分枝杆菌复合群的 IS6100 基因的特异性正向引物;

[0185] SEQ ID NO:2 的核苷酸序列为结核分枝杆菌复合群的 IS6100 基因的特异性反向引物;

[0186] 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;

[0187] 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);

[0188] 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);

[0189] 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);

[0190] 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);

[0191] SEQ ID NO:8 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物;

[0192] SEQ ID NO:9 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物;

[0193] SEQ ID NO:10 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;

[0194] SEQ ID NO:11 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;

[0195] 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;

[0196] SEQ ID NO:13 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性正向引物;

[0197] 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;

[0198] 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;

[0199] SEQ ID NO:16 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物 (NTM-2) ;

[0200] SEQ ID NO:17 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物 (NTM-2) ;

[0201] SEQ ID NO:18 的核苷酸序列为结核分枝杆菌复合群的 IS6100 基因的特异性正向引物 ;

[0202] SEQ ID NO:19 的核苷酸序列为结核分枝杆菌复合群的 IS6100 基因的特异性反向引物 ;

[0203] 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 ;

[0204] SEQ ID NO:21 的核苷酸序列为非结核分枝杆菌的 16S rRNA 基因的特异性反向引物 ;

[0205] 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 ;

[0206] 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 ;

[0207] 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 ;

[0208] 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 ;

[0209] 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 ;

[0210] 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 ;

[0211] 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 ;

[0212] 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 ;

[0213] SEQ ID NO:30 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 ;

[0214] SEQ ID NO:31 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 ;

[0215] SEQ ID NO:32 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 ;

[0216] SEQ ID NO:33 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 ;

[0217] SEQ ID NO:34 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 ;

[0218] SEQ ID NO:35 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 ;

物；

[0219] SEQ ID NO:36 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；

[0220] SEQ ID NO:37 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；

[0221] SEQ ID NO:38 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 (NTM-1)；

[0222] SEQ ID NO:39 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 (NTM-2)；

[0223] SEQ ID NO:40 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 (NTM-3)；

[0224] SEQ ID NO:41 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 (NTM-1)；

[0225] SEQ ID NO:42 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 (NTM-1)；

[0226] SEQ ID NO:43 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 (NTM-2)；

[0227] SEQ ID NO:44 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 (NTM-2)。

[0001]

<110>	UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION	
<120>	使用双重实时聚合酶链式反应和解链曲线分析对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行检测的方法	
<130>	OP-2011-0025pet	
<150>	KR 10-2010-0049691	
<151>	2010-05-27	
<150>	KR 10-2010-0062846	
<151>	2010-06-30	
<150>	KR 10-2011-0009529	
<151>	2011-01-31	
<160>	44	
<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>	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反向引物	
<400>	2	
	agtttgggtca tcagccgttc	20
<210>	3	
<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正向引物	
<400>	3	
	gggyrayctgc cctgcac	17
<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	

[0002]

<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
<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>	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正向引物	
<400>	8	
	ggtaatctgc cctgcac	17
<210>	9	
<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正向引物	
<400>	9	
	ggtaacctgc cctgcac	17
<210>	10	
<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正向引物	
<400>	10	
	ggcaatctgc cctgcac	17
<210>	11	
<211>	17	
<212>	DNA	

[0003]

<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>	11	
	ggcaacctgc cctgcac	17
<210>	12	
<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正向引物	
<400>	12	
	ggtgatctgc cctgcac	17
<210>	13	
<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正向引物	
<400>	13	
	ggtgacctgc cctgcac	17
<210>	14	
<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正向引物	
<400>	14	
	ggcgatctgc cctgcac	17
<210>	15	
<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正向引物	
<400>	15	
	ggcgacctgc cctgcac	17
<210>	16	
<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>	16	
	cateccacac cctacct	18
<210>	17	

[0004]

<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>	17	
	catcccacac cgtacca	18
<210>	18	
<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>	18	
	agaaggcgtg ctgcacctga	20
<210>	19	
<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反向引物	
<400>	19	
	ctgaaccgga tcgatgtgta	20
<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	
	catgtyttst ggkgsaaagc tt	22
<210>	21	
<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>	21	
	cgtaggagtc tgggccgta	19
<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	
	catgtcttgt gggggaaagc tt	22

[0005]

<210>	23	
<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>	23	
catgttttct ggggaaagc 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	
catgttttct ggggaaagc 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	
catgttttct ggggaaagc 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	

[0006]

catgtcttct ggtggaaage tt		22
<210>	29	
<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> 29		
catgtcttgt ggtgcaaage tt		22
<210>	30	
<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> 30		
catgttttgt ggggcaaage tt		22
<210>	31	
<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> 31		
catgtcttct ggggcaaage tt		22
<210>	32	
<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> 32		
catgttttgt ggtggaaage tt		22
<210>	33	
<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> 33		
catgttttct ggtggaaage tt		22
<210>	34	
<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	

[0007]

<400>	34	
catgttttct	gggcaaaage tt	22
<210>	35	
<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>	35	
catgttttgt	gtgcaaaage tt	22
<210>	36	
<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>	36	
catgttttct	gtgcaaaage tt	22
<210>	37	
<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>	37	
catgttttct	gtgcaaaage tt	22
<210>	38	
<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 (NTM-1)	
<400>	38	
tktggtggaa	agcttttgc	19
<210>	39	
<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 (NTM-2)	
<400>	39	
ggtgwtggt	gcaaagctt	19
<210>	40	
<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正向引物 (NTM-3)	

[0008]

<400>	40	
tggtggaaag	cgtttgg	18
<210>	41	
<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 (NTM-1)	
<400>	41	
tgtggtggaa	agcttttgc	19
<210>	42	
<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 (NTM-1)	
<400>	42	
tttgggtggaa	agcttttgc	19
<210>	43	
<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 (NTM-2)	
<400>	43	
ggtgagtgg	gcaaagett	19
<210>	44	
<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 (NTM-2)	
<400>	44	
ggtgtgtgg	gcaaagett	19

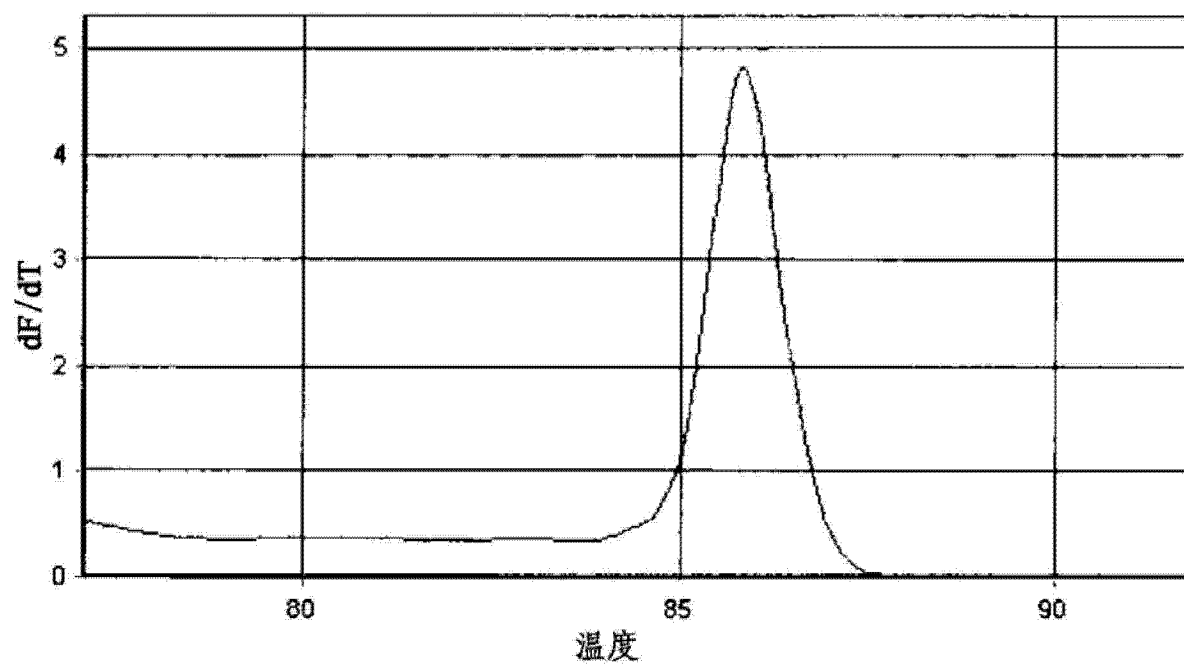


图 1

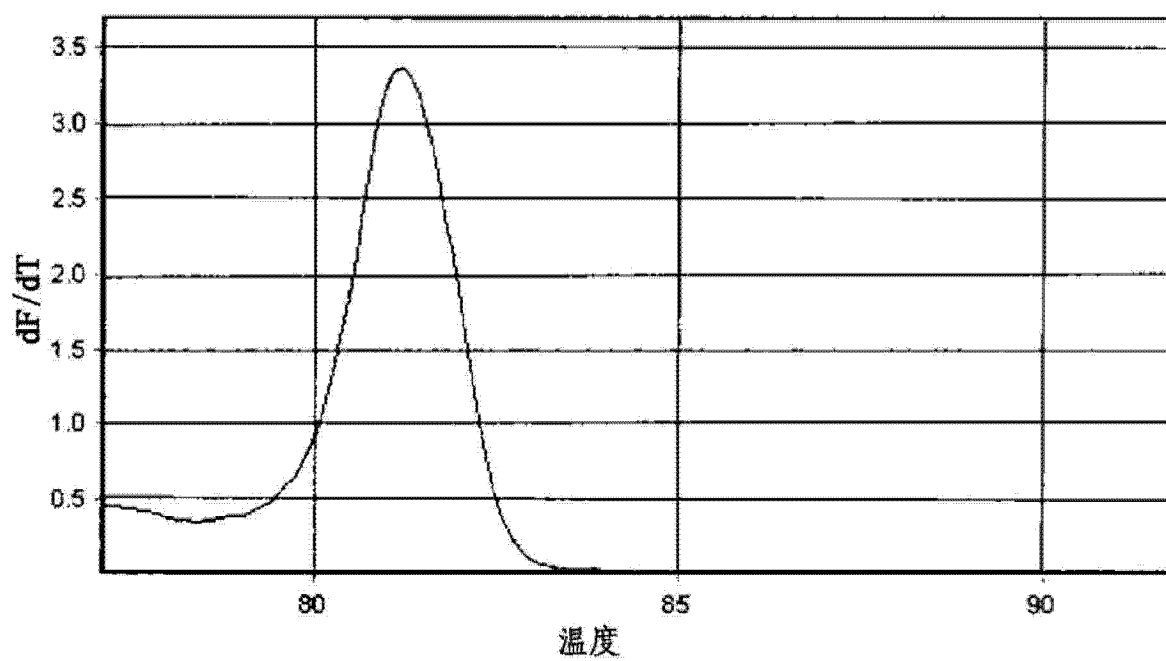


图 2

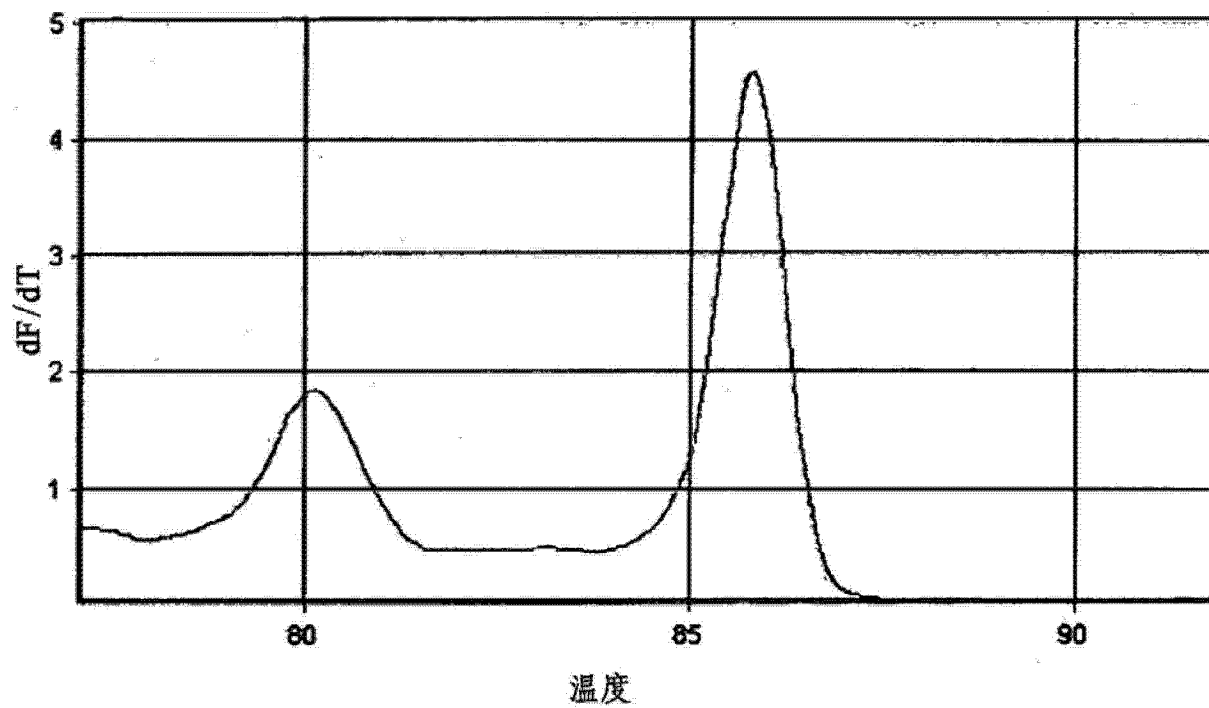


图 3

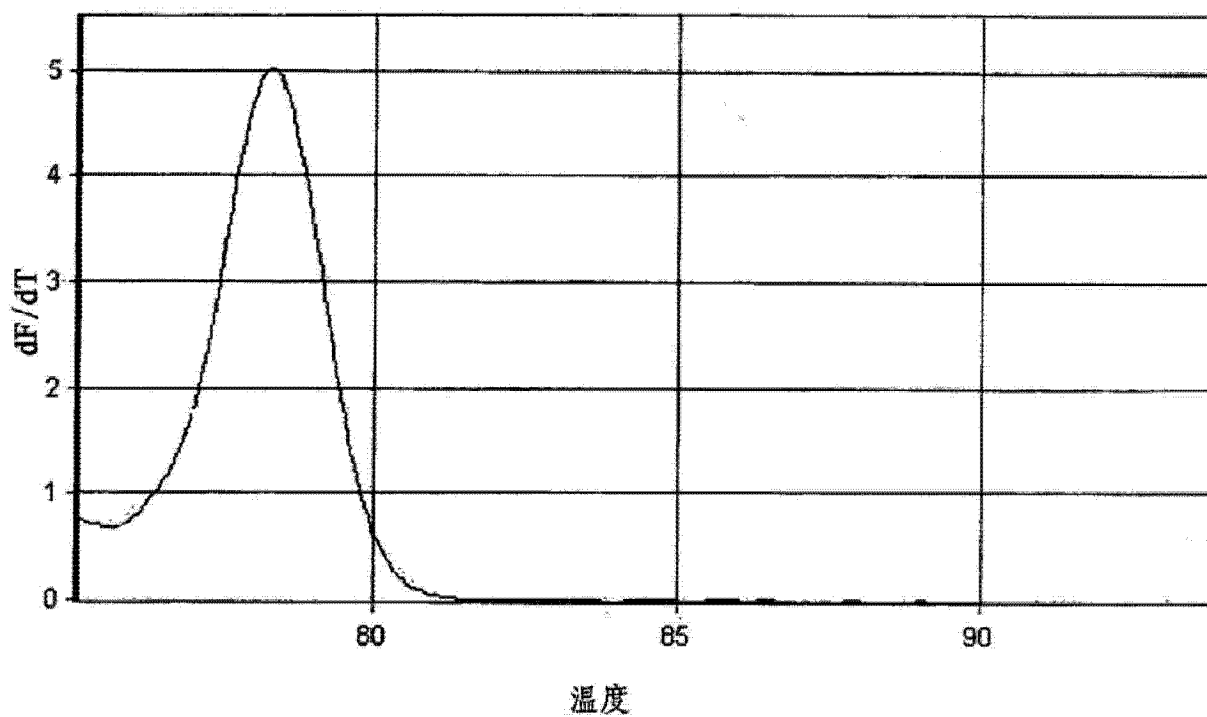


图 4

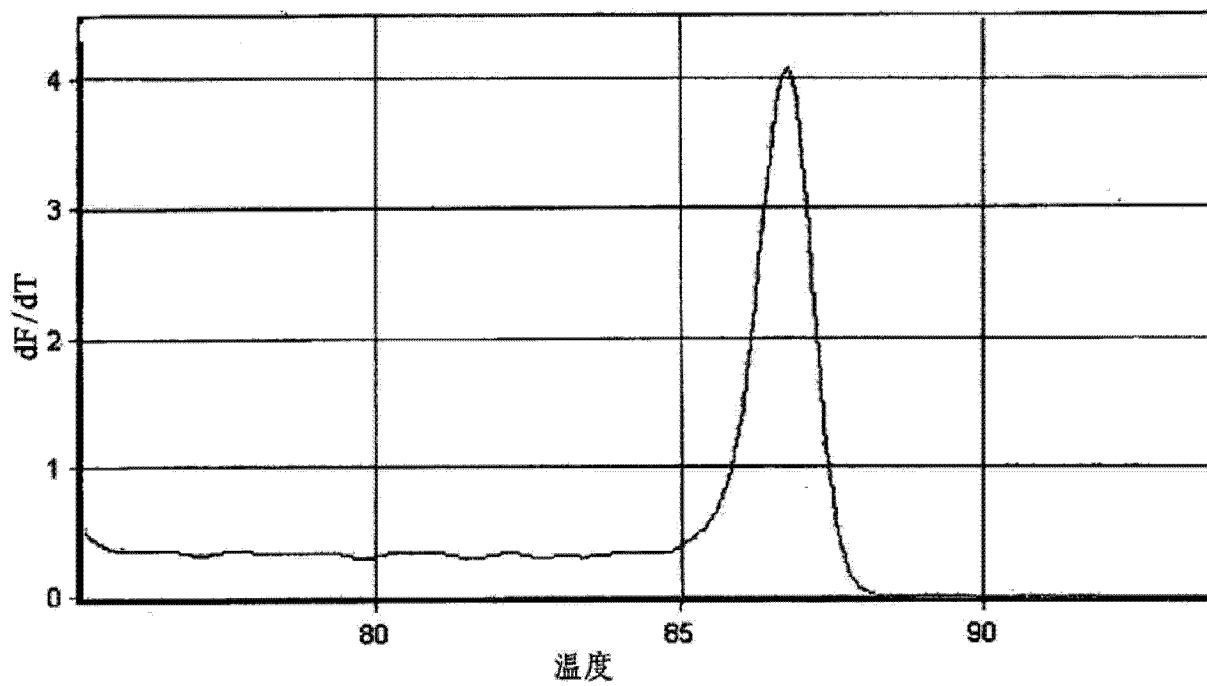


图 5

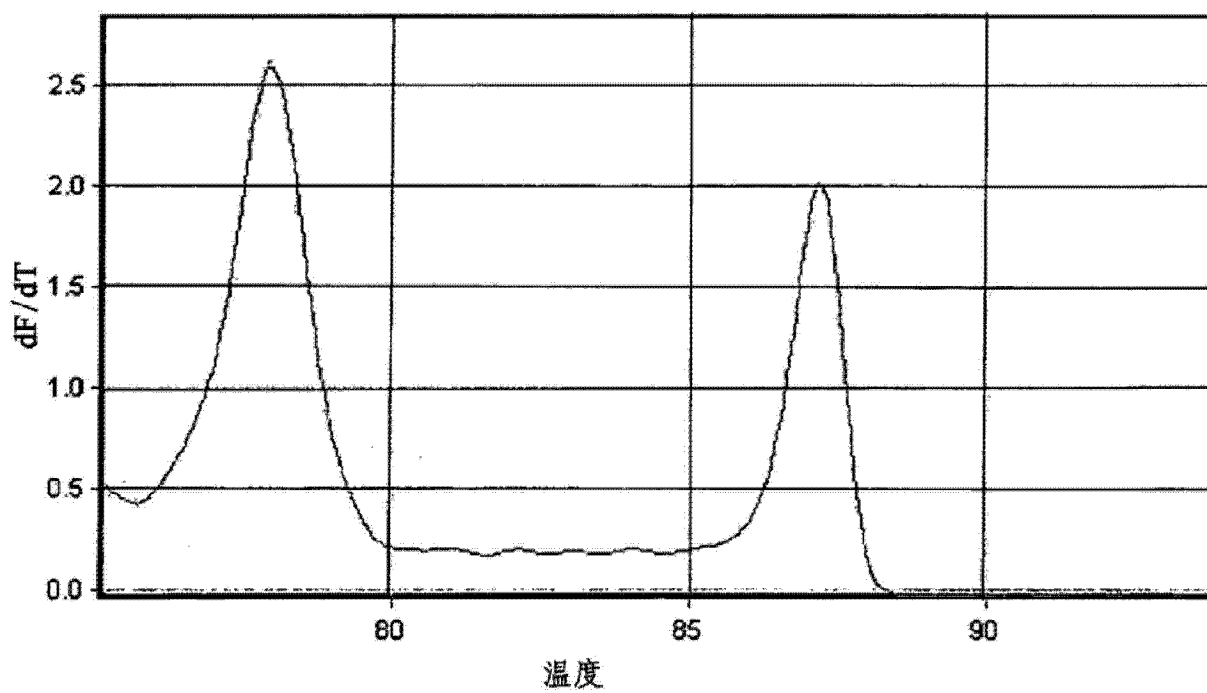


图 6

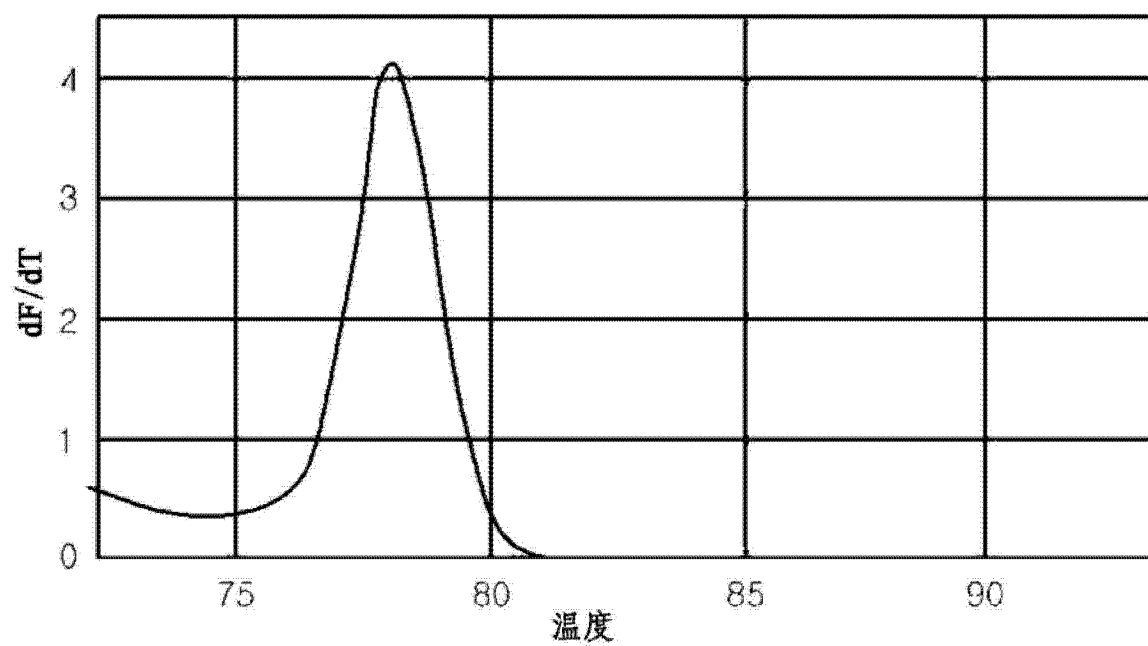


图 7

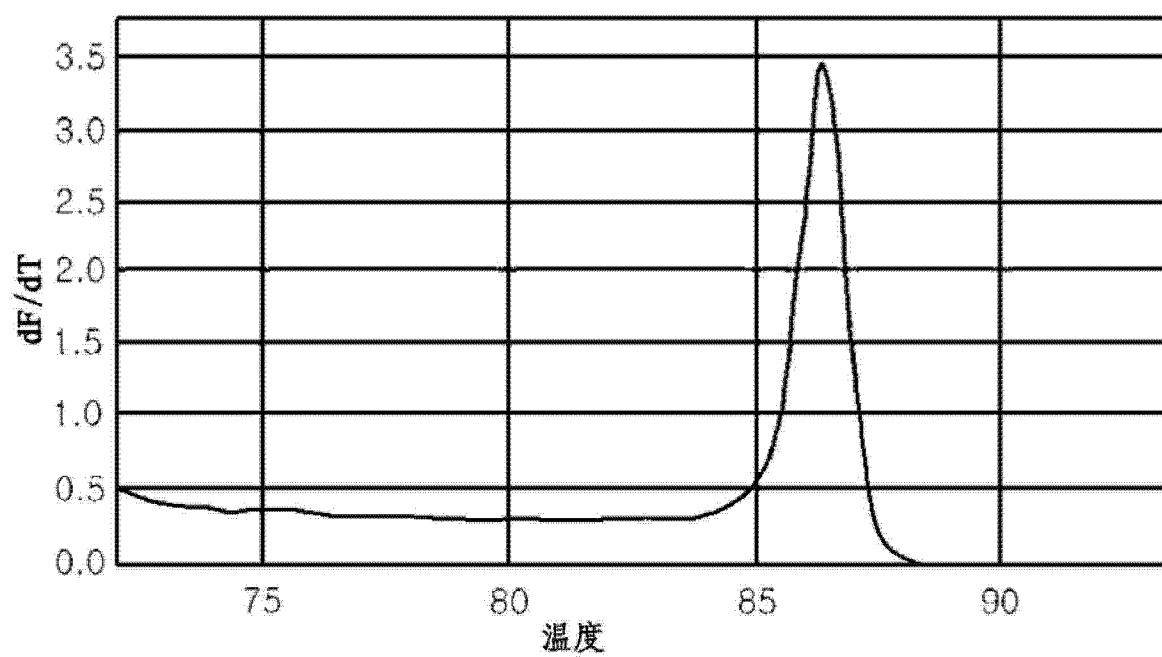


图 8

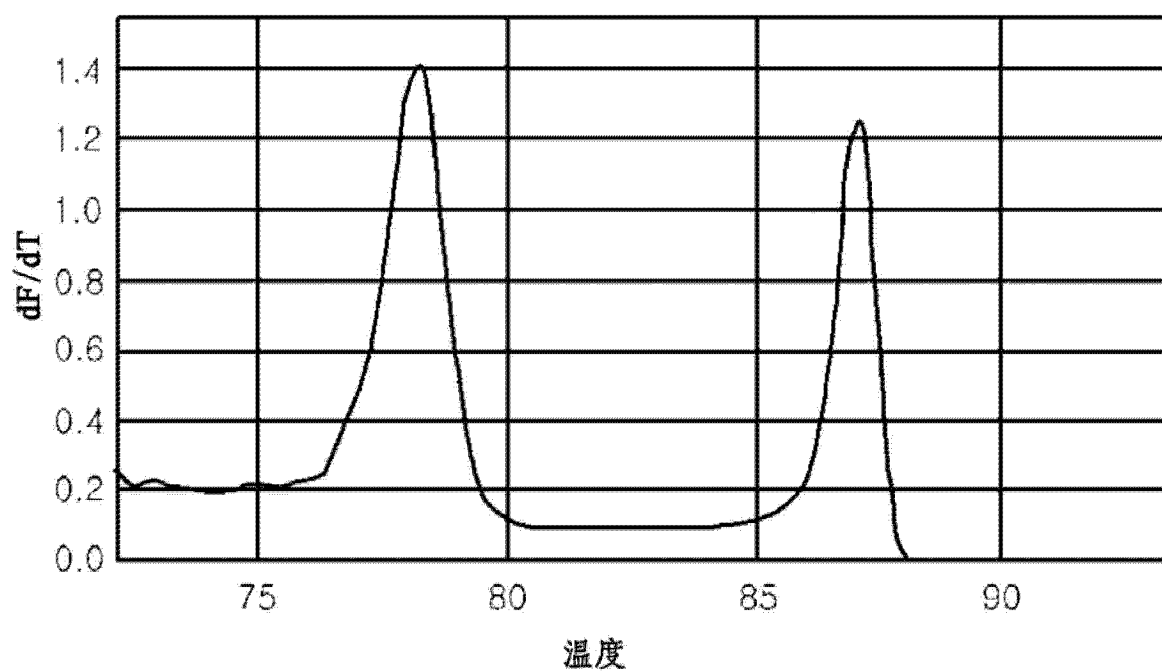


图 9