

·技术研究·

沙眼衣原体荧光 PCR 试剂盒的研制及临床考核

程 钢, 何蕴韶, 周新宇, 李 虎

(中山大学达安基因诊断中心, 广东 广州 510089)

摘 要:【目的】用荧光 PCR (fluorescence PCR, F-PCR) 方法研制沙眼衣原体 (chlamydia Trachomatis CT) DNA 检测试剂盒, 通过临床验证考核其性能, 并与其它方法比较。【方法】设计合成了 CT F-PCR 诊断试剂盒。检测了 516 份临床分泌物标本, 以 McCoy 细胞培养法和 Abbott 公司的 LCx 试剂盒为对照。【结果】阳性率 21.1%, 灵敏性 98.2%, 特异性 99.8%。【结论】F-PCR 显著优于培养法, 与 LCx 相当。F-PCR 试剂盒可以检测 CT 的真实感染情况, 对于临床诊断和疗效考察有一定的指导意义。

关键词: 聚合酶链反应, 荧光; 衣原体, 沙眼; 试剂盒, 诊断

中图分类号: R730.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)05-0397-03

Development of Chlamydia Trachomatis Fluorescence PCR Diagnostic Kit and Its Clinical Trial CHENG

Gang, HE Yun-shao, ZHOU Xin-yu, LI Hu. (DaAn Gene Diagnostic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract 【Objective】 Use a new F-PCR method to develop a chlamydia trachomatis (CT) diagnostic kit, and test it through clinical trial and compare it with other diagnostic methods. 【Method】 A clinical diagnostic kit for CT was developed with F-PCR. 516 clinical secretion samples were tested with this kit, McCoy cell culture method and LCx DNA diagnostic kit from Abbott were used as the contrast methods. 【Results】 The positive rate is 21.1%, sensitivity 98.2% and specificity 99.8%. 【Conclusion】 F-PCR is obviously superior to cell culture method, and has the same sensitivity as LCx. F-PCR can be used to monitor DNA of CT in secretion, it is useful to clinical diagnose and therapy effects monitoring.

Key words: polymerase chain reaction, fluorescence; chlamydia trachomatis; reagent kit; diagnostic

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 已广泛用于核酸分析, 遗传学测试和临床检测, 具有灵敏、迅速、准确、方便等特点。不足之处主要可归结为: 由于采用电泳检测, 易引起 PCR 产物的交叉污染, 有假阳性结果; 染色剂溴乙锭是强烈致癌物, 可能危害操作人员及污染环境。荧光 PCR 方法 (fluorescence PCR, F-PCR)^[1] 采用荧光技术和闭管检测, 具有抗交叉污染性强、定量准确、自动化分析、操作简便和安全无害等优点, 是一种先进的分子定量检测技术, 完全克服了前述常规 PCR 方法的 2 个主要缺点。我们自行设计合成了沙眼衣原体 (chlamydia trachomatis, CT) 荧光 PCR 检测试剂盒, 测试了 516 份临床分泌物标本, 采用 McCoy 细胞培养和 Abbott 公司的 LCx 试剂盒为对照指标。

1 材料与方法

1.1 标本来源

性病门诊病人 398 例, 健康体检人群 118 例, 共 516 例。男性病人用无菌棉拭子取尿道分泌物, 女性病人用无菌棉拭子取宫颈分泌物, 标本处理在采集样品后 4 h 内完成。

1.2 标准株

CT 灵敏度标准品和非 CT 特异性标准品来自中国药品生物制品检定所。

1.3 CT 荧光 PCR 诊断试剂盒的建立

引物和荧光探针位于沙眼衣原体质粒 pCTT1 基因, PCR 扩增区长 228 bp。引物序列为 PCT1: 5' CGA TGA TTT GAG CGT GTG TAG CG 3'; PCT2: 5' ATA CGA GCC AGC ACT CCA ATT TC 3'; 荧光探针 FPCT: 5' TGA GCA ATT TCA

收稿日期: 2002-05-21

基金项目: 国家“863”中试项目 (国科生字[2000]142 号文), 2001 年国家高新技术示范工程项目 (计高科[2001]1214 号文); 该试剂盒现已获批准为国家二类新生物制品 (国药证字 S20010067), 生产批准文号-国药准字 S20010084

作者简介: 程 钢 (1970-), 男, 江苏江都人, 博士, 工程师。

TTT TCC GCT CG 3'。引物和探针,在 PE394 自动核酸合成仪(美国 Perkin Elmer 公司)上合成,标记荧光探针,再经 Waters 650 HPLC 系统(美国 Waters 公司)纯化。

试剂盒的组成: CT-PCR 反应液(45 μ L/每人份,含 PCT1, PCT2, FPCT 各 10 pmol, 10 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 2 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl); DNA 裂解液(50 mmol/L NaOH, 10 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 体积分数为 1% Triton X-100, 体积分数为 1% NP-40, 0.5 mmol/L EDTA pH8.0); 阴性质控标准品(无菌生理盐水); 阳性质控标准品(CT 培养阳性株,用培养基扩增培养后,取去细胞的培养上清液用含体积分数为 15% 甘油的无菌生理盐水稀释 1 000 倍和 100 000 倍,分别作为强阳性质控标准品和临界阳性质控标准品)。

1.4 诊断试剂盒的使用方法

1.4.1 标本处理 标本试管中加入 1 mL 无菌生理盐水,充分震荡摇匀,转至 1.5 mL 离心管中(如分泌物较多,只取 0.2 mL),10 000 g 离心 5 min。沉淀加无菌生理盐水 1 mL 打匀,10 000 g 离心 5 min,再重复洗涤 1 次。沉淀直接加 50 μ L DNA 提取液充分混匀,沸水浴 10 min,10 000 g 离心 5 min,取上清液 2 μ L 做 PCR 反应。

阳性质控标准品和阴性质控标准品的处理:标准品充分混匀后,取 10 μ L 加入 40 μ L DNA 提取液充分混匀,沸水浴 10 min,10 000 g 离心 5 min,取上清液 2 μ L 做 PCR 反应。

1.4.2 PCR 反应及荧光检测 *Taq* 酶 5 u,加入 PCR 反应液 45 μ L,处理后样品或质控标准品 2 μ L,混匀,加 30 μ L 石蜡油(如所使用的 PCR 仪有热盖装置,可不加),离心数秒。将该管放入荧光检测仪,读取并记录读数 A_0 。荧光激发波长为 487 nm,检测波长为 525 nm。将各反应管放入 PCR 仪,按下列条件扩增:93 $^{\circ}$ C, 2 min 预变性,然后按 93 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 120 s,共做 40 个循环。待各 PCR 管充分冷却至室温后,放入荧光检测仪,读取并记录读数 A_1 。

1.4.3 结果判定 计算: $A_x = A_1 - A_0$ 。将阴性对照管的 A_x 称为 N,临界阳性质控管的 A_x 称为 P1,强阳性质控管的 A_x 称为 P2,若此 3 值满足 $P2 > P1 > N \cdot 1.3$,则本次实验有效。否则,实验无效,应检查试剂、仪器、反应条件等方面的误差。在实验有效的前提下,样品 $A_x > N \cdot 1.3$,判为阳性,否

则为阴性。

1.5 对照方法和诊断标准

1.5.1 对照方法 采用 McCoy 细胞培养和 Abbott 公司的 LCx 试剂盒对照指标。McCoy 细胞培养法按标准方案进行^[2],LCx 检测标本的处理和检测操作按说明书进行。

1.5.2 诊断标准 培养法做出阳性结果的标本,判定为真阳性;培养阴性但荧光 PCR 阳性且 Abbott 公司的 LCx 试剂盒同时阳性的标本,判定为真阳性。

1.6 统计学处理

采用 u 检验。

2 结果

2.1 试剂盒实验室性能评价

CT F-PCR 的反应产物,用电泳检测,则与常规 PCR 无异,都可见到 228 bp 的特异性扩增条带,见图 1。

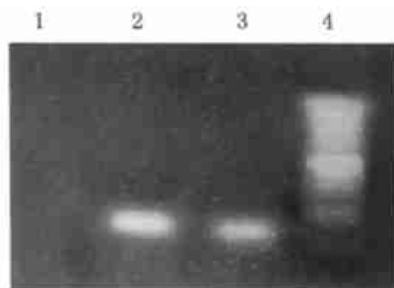


图 1 CT PCR 产物电泳图谱

Fig 1 Electrophoresis map of CT PCR product

1. negative control; 2. CT F-PCR product; 3. CT normal PCR product; 4. marker, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp up to down

CT F-PCR 试剂盒用中国药品生物制品检定所的 CT 灵敏度标准品测试,灵敏度可达 1 个 CT 颗粒。

CT F-PCR 试剂盒用中国药品生物制品检定所的特异性标准品测试,全部合格。表明试剂盒特异性良好。

2.2 临床考核统计

荧光 PCR 法的阳性率为 21.1%(109/516),明显高于培养法 15.5%(80/516),差异显著($P < 0.01$),与 Abbott 公司的 LCx 试剂阳性率 20.7%(107/516)相当($P > 0.05$)。

根据诊断标准,516 例样本中 CT 感染的真阳性数为 111 例,其中培养法、荧光 PCR 和 LCx 法检测的特异性分别为 100%、99.8%和 99.0%,3 种

方法无明显不同 ($P > 0.05$)。灵敏性分别为 72.1%、98.2% 和 96.4%，荧光 PCR 和 LCx 法均明显高于培养法 ($P < 0.01$)。

样本的总真阳性数为 111 例。结果见表 1、2 和表 3。

表 1 3 种方法检测 CT 的阳性结果

Table 1 The positive results of three methods in diagnosing CT [n (%)]

	Cell culture	F-PCR	LCx
High-risk population	77(19.3)	108(26.4)	110(26.9)
Healthy population	3(2.5)	3(2.5)	3(2.5)

表 2 3 种方法检测结果比较

Table 2 The comparison among the results of three methods (n)

	Cell culture		F-PCR		LCx	
	+	-	+	-	+	-
Cell culture +	80	0	78	2	76	4
Cell culture -	0	436	32	404	35	401
F-PCR +			112	0	107	5
F-PCR -			0	404	4	400
LCx +					111	0
LCx -					0	405

+: number of positive samples -: number of negative samples

表 3 培养法、荧光 PCR 和 LCx 技术指标比较

Table 3 The technique indexes of cell culture, F-PCR and LCx (%)

	Cell culture	F-PCR	LCx
Sensitivity	72.1	98.2	96.4
Specificity	100	99.8	99.0
Accuracy	94.0	99.4	98.4
Positive rate	15.5	21.1	20.7

Sensitivity = number of true positive / (number of true positive + number of false negative); Specificity = number of true negative / (number of true negative + number of false positive); Accuracy = (number of true positive + number of true negative) / number of total samples; Positive Rate = number of true positive / number of total samples

3 讨论

CT 培养阳性的 80 例标本, 荧光 PCR 和 LCx

法分别有 78、76 例为阳性, 对其余几例结果不符的标本经反复冻融并稀释 10 倍后, 结果为阳性, 用它们的培养标本作荧光 PCR 和 LCx 试验, 也证实为阳性。这几个病例都为女性患者, 造成假阴性的原因可能是这些标本中存在特别高浓度的扩增反应抑制物所致。培养法为阴性的 436 例中, 荧光 PCR 法查出 32 例阳性, LCx 法查出 35 例阳性, 其中 31 例荧光 PCR 和 LCx 法均为阳性, 1 例荧光 PCR 阳性而 LCx 法阴性, 4 例 LCx 阳性而荧光 PCR 阴性, 这几例标本经反复交叉试验, 也都为阴性标本, 同时对这几例病人随访 1 个月后, 排除了性病。迄今为止, 荧光 PCR 方法在防止 PCR 产物污染最成功, 但该方法在标本的处理上尚需人工操作, 这样就存在标本间的相互污染, 这 1 例荧光 PCR 假阳性, 可能是这一原因造成。健康人群中 3 种不同方法均查见 3 例阳性, 可判定为真阳性, 这 3 例属于无临床症状的带菌者。荧光 PCR 和 LCx 法在特异性、灵敏性和阳性率等方面无明显不同, 说明我们采用的荧光 PCR 方法达国外先进水平。

荧光 PCR 技术是在常规 PCR 基础上, 添加了一条荧光双标记的探针, 一个标记在探针的 5' 端, 称为荧光报告基团 (R), 另一个标记在探针的 3' 端, 称为荧光抑制基团 (Q), 两者可构成能量传递结构, 即 5' 端荧光基因所发出的荧光可被另一荧光基因吸收或抑制。探针的 3' 端羟基 (-OH) 已被去除或封闭, 不具有延伸能力。探针在无特异性 PCR 发生时, 荧光信号不改变, 当有特异性 PCR 扩增发生时, 探针会在 PCR 过程中被 Taq 酶的 5' → 3' 活性作用而切断 (切口平移效应)^[3], 抑制作用消失, 从而引起报告基团荧光信号的增长。荧光信号伴随着 PCR 的过程的进行, PCR 产物的增长而增长。荧光 PCR 方法就是利用此原理, 在 PCR 反应前后, 分别检测特定荧光信号的变化, 得到信号增强值。再利用实验确定的信号增强阈值, 既可以判别样品的阴阳性。

荧光 PCR 是进行临床基因诊断的有力手段, 从早期的斑点杂交法^[4], bDNA 法^[5], 到竞争性 PCR^[6], PCR-ELISA^[7] 等, 困扰临床检验人员的难题是 PCR 的假阳性污染。这些方法都有赖于各种不同类型的 PCR 后处理过程, 使数量巨大的 PCR 产物容易飞散到空气中。与这些传统方法不同, 新出现的荧光 PCR (F-PCR) 方法采用完全闭管检测, 不需 PCR 后处理^[8], 为 PCR 全面进入临床应用打

开了希望之门^[9, 10]。

沙眼衣原体是引起非淋球菌性尿道炎、阴道炎的主要病原体之一。长期以来分离培养一直作为诊断非淋球菌性尿道炎、阴道炎的主要方法。分离培养条件要求高,假阴性率高,不易推广。因此寻找建立特异、敏感、快速、准确的检测方法则变得非常迫切。可以预见,随着分子诊断概念和技术的发展与推广,F-PCR在沙眼衣原体的诊断、和疗效考察方面必将有广泛的应用。

(中山大学达安基因诊断中心的高劲松博士,邓文国博士生和许擎技师在实验过程中提供了很大帮助,在此诚挚谢意)

参考文献:

- [1] Livak K J, Fiod S J A, Mamaro J, *et al.* Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization [J]. *PCR Methods and Appl* 1995, 4(6): 357.
- [2] Lampe M F, Balkweber L M, Stamm W E. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to chlorhexidine gluconate gel. [J] *Antimicrob Agents Chemother*, 1998 42(7): 1726.

- [3] Holland P M, Abramson R D, Watson R, *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(16): 7276.
- [4] Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S, *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences [J]. *Biotechnology*, 1992, 10(4): 413.
- [5] Chen C H, Wang J T, Li C Z, *et al.* Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in human sera by branched-DNA signal amplification [J]. *J Virol Methods*, 1995, 53(1): 131.
- [6] Jalava T, Lehtovaara P, Kallio A, *et al.* Quantification of hepatitis B virus DNA by competitive amplification and hybridization on microplates [J]. *Biotechniques* 1993, 15(1): 134.
- [7] Nolte F S, Thummond C, Fried M W. Preclinical evaluation of AMPLICOR hepatitis C virus test for detection of hepatitis C virus RNA [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(7): 1775.
- [8] 李影,何蕴韶,程钢等.用荧光定量PCR方法检测转染细胞中外源基因的拷贝数[J].*中山医科大学学报*, 2001, 22(1): 8.
- [9] 苏学飞,左中越,程钢等.荧光定量PCR检测性病病原体的临床价值[J].*实用医学杂志*, 2001, 17(6): 561.
- [10] 李丹,杨力芳,钟梅等.实时定量PCR检测技术应用于孕妇人巨细胞病毒感染[J].*中国优生与遗传杂志*, 2000, 8(6): 4.

(编辑 黄小延)

(上接第 396 页 from page 396)

所以,对无缺氧的未成熟心肌,当缺血时间不长,心肌细胞自身的无氧酵解产能足以维持未成熟心肌缺血期间的能量需求;这时,传统的冷晶体停跳液就能使心肌得到较好的保护。

另外,实验结果还显示:温血诱停再灌注后心肌的含水量、细胞线粒体、细胞核等超微结构较用冷晶体停跳液好。这可能与含血停跳液具有较晶体停跳液高的胶体渗透压,而能起到减轻心肌细胞水肿的作用有关;同时用温血复跳前再灌注使冠状血管扩张,有利于冲洗无氧酵解产生的酸性产物(H^+ , CO_3^- 和乳酸),作为复跳前的预处理,并偿还氧债,为即将复跳的心脏提供良好的内环境。是否存在其它的作用机理有待进一步研究。

因此,温血诱导停跳及再灌注和冷晶体停跳液,对未成熟心肌能量代谢和减轻缺血再灌注损伤方面的保护作用相同;但前者对心肌细胞超微结构的保护作用较好,细胞水肿程度较为轻微。

参考文献:

- [1] Hammon J W Jr. Myocardial protection in the immature heart [J]. *Ann Thorac Surg*, 1995, 60(5): 839.
- [2] Williams W G, Rebeyka I M, Tibshirani R J, *et al.* Warm induction blood cardioplegia in the infant: a technique to avoid rapid cooling myocardial contraction [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1990, 100(5): 890.
- [3] Jonas R A. Myocardial protection for neonatal and infants [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, 46(suppl): 288.
- [4] Nishioka K, Jarmakani J M. Effect of ischemia on mechanical function and high-energy phosphates in rabbit myocardium [J]. *Am J Physiol*, 1982, 242(5): 1077.
- [5] Kofsky E, Juilia P, Buckberg G D. Studies of myocardial protection in the immature heart: V. Safety of prolonged aortic clamping with glutamate/aspartate blood cardioplegia [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1991, 101(1): 34.

(编辑 张敏瑞)