

· 技术交流 ·

用聚合酶链反应快速检测痰液中结核杆菌^①

杨绍基^② 凌小强 吕 凌 高志良 李 刚 姚集鲁

(中山医科大学附属第三医院传染病科;广州,510630)

提 要 本研究以结核杆菌染色体中重复出现的长度为 123 个碱基对(bp)的 DNA 片段作为聚合酶链反应(PCR)扩增的模板,合成一对寡核苷酸引物。痰液标本先经三羟甲基氨基甲烷(Tris),乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)和三硝基甲苯(Triton x-100)加热、震荡处理,裂解结核杆菌,再作 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳。同时,与痰液直接涂片、抗酸染色镜检抗酸染色阳性杆菌作比较。用该 PCR 检测的检出率为 91.4%(32/35),而涂片抗酸染色的检出率仅为 34.3%(12/35)。两者相比有非常显著性差异($\chi^2=24.476, P<0.001$)。由于改进了 PCR 前痰液标本的处理方法,使整个 PCR 检测过程所需时间缩短至 9h。我们认为该 PCR 检测结核杆菌是特异、敏感和快速的,可在临床实验室应用。

主题词 结核杆菌/分析;聚合酶链反应

中图分类号 R521

肺结核是最常见的结核病。用痰液作直接涂片、经染色后用显微镜检查,找抗酸染色阳性杆菌是最常用、简单和快速的病原学诊断方法。但该方法较费神、检出率低。因结核杆菌的繁殖周期较长,一般为 12~18h,故培养常需 4~8 周才有结果。即使用培养基中含 C¹⁴标记棕榈酸的 BACTEC 系统作培养,也约需 13d 才出现阳性^[1]。近年来建立的 PCR 检测结核杆菌 DNA 的方法有特异性强,敏感度高,快速的优点^[2~4]。为了提高检测的敏感度,本研究采用了 Eisenach 等的方法^[5],合成一对引物,以在结核杆菌染色体基因中重复出现的 DNA 片段为靶 DNA,经 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳后观察结果。在该研究中,作者改进了标本的处理方法,用强力裂菌剂、加热和震荡处理,直接用结核杆菌裂解、释放出的 DNA 作为 PCR 扩增模板,使该 PCR 检测技术更易在临床实验室中应用。

1 材料与方 法

1.1 菌 株

结核杆菌 H37Ra 株由广东省结核病防治研究所提供。结核杆菌 H37Rv 株由本医院内科呼吸实验室提供。均用罗氏(Lowenstein-Jensen)培养基于 37℃培养 4 周后应用,作为阳性对照。

新型隐球菌由本医院皮肤科实验室提供。用沙氏(Sabouraud)琼脂于 37℃培养 72h 后收集生长旺盛的新型隐球菌,作为阴性对照。

1.2 痰液标本

35 份痰液标本均取自广州胸科医院的门诊病人。男 24 例,女 11 例,年龄 23~76 岁,平均 54.6 岁。经胸部 X 线检查,结果均诊断为肺结核病。

1.3 涂片检查

取痰液中粘稠、脓性部分在载玻片上制成直径为 1~1.5cm 厚的涂片,置 105℃烘箱内 10min,取出后自然降至室温,作抗酸染色后用油镜(放大 1 000 倍)检查。

1.4 引 物

① 本课题由中山医科大学科研基金资助;

② 第一作者,1944 年出生,男,副教授

寡核苷酸引物的顺序为:引物 1:5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3'; 引物 2:5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'。参照 Eisenach 等的方法^[5],由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。

1.5 标本预处理

经 100℃15min 杀灭痰液标本中可能存在的结核杆菌和其它病原体后,用无菌双蒸馏水作 1 倍稀释,混匀。在容积为 0.5ml 的小离心管中加入裂解液 12μl 和经上述方法处理的痰液标本 48μl,混匀,使最终浓度分别为 Tris 10mmol/L,EDTA-2Na 1mmol/L 和 Triton X-100 5%(V/V),96℃20min 后用 Vortex 震荡器震荡 3min。离心,11 000r/min,5min,取上清作 PCR 检测。

1.6 PCR 扩增

总体积为 30μl,其中,10 倍浓度扩增缓冲液(含 Tris-HCl100mmol/L,KCl500mmol/L, MgCl₂ 15mmol/L) 3μl, dNTPs (2.5mmol/L)3μl,引物 1 和引物 2(25pmol/L)各 0.5μl,稀释液(含明胶 0.1%, Triton X-100 0.1%) 19.75μl, Taq DNA 聚合酶 0.25μl(0.75u),模板 DNA 3μl,混匀,加无菌石蜡油 30μl 覆盖。在自动 DNA 扩增仪(Perkin-Elmer Cetus)中,先经 94℃变性 5min,然后作 30 个循环扩增。每个循环包括 94℃、50s,50℃、50s 和 72℃、1min。最后于 72℃延伸 5min。每次均作标准阴性与阳性对照。

1.7 产物判断

每份 PCR 产物取 10μl,与 0.25%溴酚蓝 3μl 混匀,经用 2%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5μg/ml)电泳(100V,40min)后在紫外线透射仪上观察荧光区带,以 123bp 的分子量标准参照(Gibco BRL)判断结果。

2 结果

2.1 PCR 产物

用结核杆菌 H37Rv 株,H37Ra 株和含

有结核杆菌的痰液标本裂解液中 DNA 作模板,PCR 扩增产物为 123bp 的 DNA 片段。在含溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶中电泳后,在紫外线透射仪上观察,在 123bp 处有一条清晰的区带。以新型球菌作阴性对照无此区带。

2.2 痰涂片与 PCR 检测结果

痰涂片与 PCR 检测结果如附表所示。

附表 35 份痰液标本的涂片与 PCR 检测结果(例数)

痰涂片抗酸染色阳性杆菌		PCR 检测
密度	n	阳性数
(+++)	4	4
(++)	5	5
(+)	2	2
1~2 条	1	1
(-)	23	20
合计	35	32

在这 35 例临床诊断为肺结核病的患者中,只有 12 例痰涂片发现抗酸染色阳性杆菌。按王德理介绍的密度划分法^[6],其中 4 例每个视野可找到 1~10 条抗酸染色阳性杆菌(+++),5 例全部涂片共可找到 10~99 条(++),2 例共找到 3~9 条(+),1 例可找到 2 条,检出率为 34.3%(12/35)。

用这些病人的痰液标本作 PCR 检测,结果 32 例阳性,检出率为 91.4%(32/35)。有 12 例痰涂片找到抗酸染色阳性杆菌者,其 PCR 结果均呈阳性;23 例涂片找不到抗酸染色阳性杆菌者,其中 20 例 PCR 结果阳性。

这两种方法检出率的差异,卡方检验提示有极显著性意义($\chi^2 = 24.476, P < 0.001$)。

3 讨论

用标本直接涂片,作抗酸染色后找抗酸染

色阳性杆菌虽然有快速之优点,但检出率较低。若标本中结核杆菌的密度低于 10 000/ml,则较难检出。用 PCR 检测结核杆菌具有特异性强(98%~100%),敏感度高(55%~98%)和快出结果的优点^[7]。

本研究的 PCR 模板为结核杆菌染色体的一个 123bp DNA 片段。Eisenach 等已证明该 DNA 片段只存在于人和牛型结核杆菌中,而不存在于其它分支杆菌、细菌和人细胞的 DNA 中,特异性强。而且,在结核杆菌染色体中,该 DNA 片段重复出现 10~16 次。因此,以该 DNA 片段作为扩增的模板,可大大提高 PCR 检测的敏感度。在 3 μ l 标本中,只需含有 1fg 结核杆菌染色体 DNA,约相当于 1/5 条结核杆菌的染色体 DNA 量,即可使检测结果阳性^[5]。

本组痰液标本的 PCR 结核杆菌检出率为 91.4%,明显高于直接涂片的检出率 34.3%($\chi^2=24.476, P<0.001$)。

陈一平等 PCR 检测结核杆菌时,需先用蛋白酶 K 或溶菌酶裂解结核杆菌,再用酚与氯仿抽提,乙醇沉淀其 DNA 作为 PCR 扩增的模板,操作较复杂,完成整个检测过程需 36h^[8]。本研究采用 Tris, EDTA-2Na 和 Triton X-100,加热、震荡裂解结核杆菌,使其释放出染色体 DNA,直接用作扩增的模板,操作简化,使完成整个检测过程所需时间从 36h 缩短至 9h。

因新型隐球菌的肺和中枢神经系统感染在临床上酷似结核杆菌感染,故本研究用新型隐球菌作为阴性对照。

Victor 等认为血红蛋白可抑制 PCR 反应^[9]。在本组痰液标本中,有 2 份呈明显血性,镜下可见大量红细胞和白细胞,但其 PCR 检测结果均呈阳性。这可能与痰液中的血红蛋白在处理过程中已被变性、沉淀清除有关。

参 考 文 献

- 1 Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al. Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 1992, 30 : 878
- 2 Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet*, 1989, 11 : 1069
- 3 Altamirano M, Kelly MT, Wong A, et al. Characterization of a DNA probe for detection of mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, 30 : 2173
- 4 Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, et al. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1992, 30 : 255
- 5 Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis*, 1990, 161 : 977
- 6 王德理主编. 实用结核病防治学. 济南: 山东科学技术出版社, 1992, 1
- 7 Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM et al. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of mycobacterium tuberculosis in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol*, 1993, 31 : 2049
- 8 陈一平, 翁心华, 唐榕, 等. 聚合酶链反应对结核杆菌 DNA 重复序列的检测. *上海医科大学学报*, 1993, 20 : 81
- 9 Victor J, Toit RD, and helden PDV. Purification of sputum samples through sucrose improves detection of mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, 30 : 1514

(1994-09-28 收稿 1995-02-24 修回)

RAPID DETECTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN SPUTUM SAMPLES BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Yang Shaoji Ling Xiaoqiang Lu Ling
Gao Zhiliang Li Gang Yao Jilu

(Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Third Affiliated Hospital,
Department of Infectious Disease, Guangzhou, 510630)

A 123-base-pair fragment repeated in the chromosome of *Mycobacterium tuberculosis* was used as target DNA for amplification with polymerase chain reaction (PCR) in this study. A pair of oligonucleotide primers was synthesized. Sputum samples were heated at 96°C for 20 minutes in solution containing Tris, EDTA-2Na and Triton X-100, and treated with vortex shaker for 3 minutes to lyse *M. tuberculosis*. PCR products were analyzed by electrophoresis through agarose gels with ethidium bromide staining. Sputum Smears were treated with Ziehl-Neelsen staining to detect acid-fast bacilli with microscopy. The positive rates of PCR and microscopy were 91.4% and 34.3% respectively ($\chi^2=24.476, P<0.001$). Results of PCR can be obtained in about 9 hours because preparation method of sputum samples for PCR was improved. This simplified PCR, in our opinion, is specific, sensitive and rapid for detecting *M. tuberculosis*, and can be performed in clinical laboratories.

Subject headings mycobacterium tuberculosis/analysis; polymerase chain reaction

(上接第 72 页)

carried out and 7 main diseases were found among the children. Phimosis was the most frequent one with a trend of the smaller age the higher incidence rate ($r_s = -0.937, P < 0.0001$). The biggest variation of age specific rate was located between 5 and 6 years and the decline was quite small after that. The rates for 3, 6, 10 aged groups were 33.02%, 16.72%, 10.37% respectively and the difference among them was statistically significant (chi square = 107.75, P value less than 0.0001). The cases of other abnormalities were 33 for hernia (1.27%), 8 for cryptorchidism (0.27%), 4 for testicular hydrocele, 2 for hypospadias and 1 for buried penis and preputial bursa. The optimal age of cosmetic operation for the diseases was discussed.

Subject headings child; genital diseases, male; epidemiology