DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).1995.0037

应用嵌套式 PCR 法检测结核杆菌 DNA①

张天托② 唐英春 张扣兴 龙伟潮 饶 宪

(中山医科大学附属第三医院内科;广州,510630)

提 要 应用嵌套式聚合酶链反应(nested PCR)法检测结核菌 DNA,所用内、外两对寡核苷酸引物衍生于 37.7u(38kDa)蛋白抗原 b 的编码(Pab)DNA 序列。对 6 种抗酸分枝杆菌和 10 种非分枝杆菌 DNA 进行扩增,经琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色证实,只有人型结核杆菌、牛型结核杆菌和卡介苗(BCG)出现 322bp 特异扩增带,而其他菌种未见此种扩增。第 1 步和第 2 步 PCR 分别检测到的最低限量为 10pg 和 10fg 的靶 DNA。采用此法检测 72 份临床标本,结果显示:该技术具有特异性强、敏感性高、快速简便的优点,尤适用于肺内外结核的早期诊断。

主题词 结核杆菌/遗传学;聚合酶链反应/方法;脱氧核糖核酸/分析

中图号 R378.91;Q523

确认结核杆菌是诊断结核病最特异、最重要的依据。传统的细菌学检查方法如涂片镜检、培养等,由于阳性率低或检查周期过长,使早期诊断受到一定限制。近年来随着聚合酶链反应(PCR)技术的广泛应用,国内外已有用之检测结核杆菌的报道[1,2],从而成为在分子和基因水平诊断结核杆菌感染的新方法。本文对嵌套式 PCR(nested PCR)检测结核杆菌 DNA 及其临床应用价值进行探讨。

1 材料和方法

1.1 菌 株

标准结核杆菌 *M. tuberculosis*($H_{37}Rv$),*M. bovis*,*M. avium*,*M. kansasii*,*M. intracellulare*,*M. bovis* BCG(兰州生物制品研究所),金黄色葡萄球菌 ATCC 26003,表皮葡萄球菌 ATCC 26101,α-溶血性链球菌 ACTT 32205,β-溶血性链球菌 ATCC 32204,肺炎球菌 ATCC 31108,肺炎克雷伯杆菌 NCTC 9632,绿脓杆菌 ATCC 10211,嗜肺军团菌种 I 型 ATCC 33152,大肠杆菌 ATCC 44113,流感嗜血杆菌(临床分离株)均为本室保存菌株。

1.2 标 本

待检标本为痰、胸水、脑脊液、尿及支气管肺泡灌洗液。取自本院门诊、病房及纤支镜室的患者,部分标本来源于院外。

1.3 引 物

两对寡核苷酸引物来自结核杆菌 37.7u(38kDa)蛋白抗原 b (protein antigen b,Pab)的编码基因[3],其序列见表 1。Pa 和 Pb 作为外引物可扩增片段为 418bp,Pc 和 Pd 作为内引物可扩增片段为 322 bp(表 1)。

1.4 DNA 抽提

取悬浮的纯培养细菌或胸水、肺泡灌洗液、中段尿液、脑脊液,13 000 r/min 离心 10 min 去上清。痰液则先加入二巯基苏糖醇 10 μl,置 37℃30 min 并反复摇匀,13 000 r/min 离心 10 min 去上清后加入 TE buffer 洗涤 1 次,再 13 000 r/min 离心 10 min,去上清液。然后所有标本管中均加入 TE buffer 360 μl,

① 校科研基金资助课题;

② 第一作者,1962 年出生,男,硕士,讲师

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

再依次加入溶菌酶 10 μl，蛋白酶 K 20 μl，10% SDS 40 μl。根据标本来源情况，分别用平衡酚 400 μl，平衡酚：氯仿：异戊醇(25：24：1)400 μl，氯仿：异戊醇(24：1)400 μl，各抽提 1～2 次。水相中加入 3 mol/L 醋酸 40μl，无水乙醇 880 μl 置－70℃沉淀 30 min，沉淀物用 70%乙醇洗涤，风干后备用。

表 1 套式 PCR 引物序列

名 称	核苷酸位置	引 物 序 列
Pa	232-252	5′-ACCACCGAGCGGTTCGCCTGA-3′
Pb	629-649	5′-GATCTGCGGGTCGTCCCAGGT-3′
Pc	303-320	5′-TGACGTTGGCGGAGACCG-3′
Pd	607-624	5′-ATGGTGCCCTGGTACATG-3′

1.5 PCR 循环

第 1 次 PCR 在 Eppendorf 管中加入三蒸水 25 μl，10×Buffer 5μl，dNTP (200 μmol/L) 5 μl，引物 Pa、Pb 各 2.5 μl(20pmol)，Taq DNA 聚合酶(美国 P.E Cetus 公司) 1.25U 混匀，取抽提后的 DNA 10μl 作为模板，加入反应液中进行 PCR 循环 35 周期。第 1 周期为 94℃变性 10min，63℃退火 90s，72℃延伸 60s。第 2 周期至第 35 周期为 94℃变性 60s，63℃退火 90s，72℃延伸 60s 至反应结束。第 2 次 PCR 除引物改为 Pc、Pd(20 pmol)各 2.5 μl，模板为 10 μl 第 1 次 PCR 产物外，余均同第 1 次 PCR。

1.6 结果判定

分别吸取第 1 次和第 2 次 PCR 反应产物 7μl，加入溴酚蓝载样缓冲液 3 μl，以含 0.5 μl/ml 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶电泳。4V/cm 电泳 30 min，然后在紫外线下与 DNA Marker 比较在 418bp 或 322bp 处出现荧光亮带者为结核菌 DNA 阳性，否则为阴性，每次实验均分别设置结核菌 DNA 阳性、阴性(正常标本或试剂)对照，结果相符时才进行诊断。

2 结 果

2.1 特异性

为检测本实验所选引物的特异性，在同样条件下扩增了 *M. tuberculosis*，*M. bovis* *M. bovis* BCG 和 3 株非典型分枝杆菌，5 株革兰阳性球菌，5 株革兰阴性杆菌。结果表明 37.7u(38kDa)蛋白抗原 b 衍生的引物只扩增牛型、人型结核菌和 BCG，与其它菌株无交叉扩增反应，显示特异性高，结果如图 1。

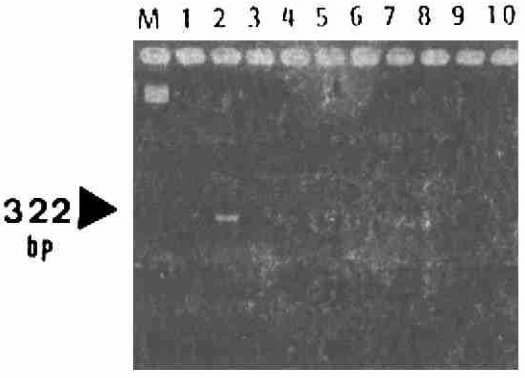


图 1 嵌套式 PCR 扩增 38kDa Pab DNA 序列的特异性
M：DNA 分子量标准：123bp DNA Ladder1. *M. bovis* BCG，2. 人型结核杆菌($H_{37}Rv$)，3. 堪萨斯分枝杆菌，4. 鸟分枝杆菌，5. 胞内分枝杆菌，6. 肺炎克雷白杆菌，7. 绿脓杆菌，8. 嗜肺军团菌Ⅰ型，9. 大肠杆菌，10. 流感嗜血杆菌

2.2 灵敏度

将已纯化的结核杆菌 DNA 进行系列稀

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

释后作模板，检测该技术的 DNA 最低检出度，第 1 次用外引物扩增后检出低限为 10pg，再以内引物进行第 2 次扩增后，检出低限为 10pg，第 2 次扩增比第 1 次扩增灵敏度增高 1 000 倍，结果如图 2。

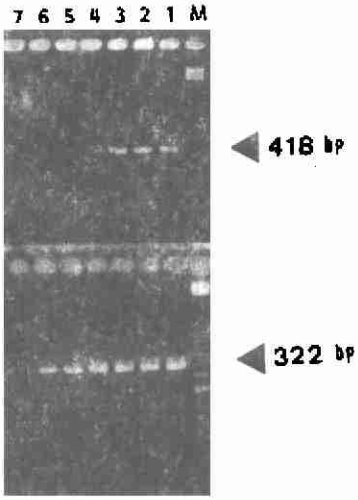


图 2　第 1 步 PCR(上)与第 2 步 PCR(下)的检出值
M：分子量标准：123bp DNA Ladder，
1. 1ng　DNA，2. 10^2 pg DNA，3. 10pg DNA，4. 1 pg DNA，5. 10^2 fg DNA，6. 10fg DNA，7. 1fg DNA

2.3　标　本

来自临床病人 72 份标本，分别进行涂片镜检、培养和 PCR，结果显示凡涂片或培养阳性者，PCR 检测均为阳性，而嵌套式 PCR 阳性标本中，7 份在 PCR-EB 检测中为阴性，结果如表 2、图 3。

表 2　不同检测方法阳性标本数(份数)

标　本	N	镜检	培养	PCR-EB	嵌套式 PCR
痰	39	8	8	12	16
肺泡灌洗液	8	0	0	2	3
胸　水	11	0	1	2	3
中段尿	9	1	1	1	2
脑脊液	5	0	0	2	2
合　计	72	9	10	19	26

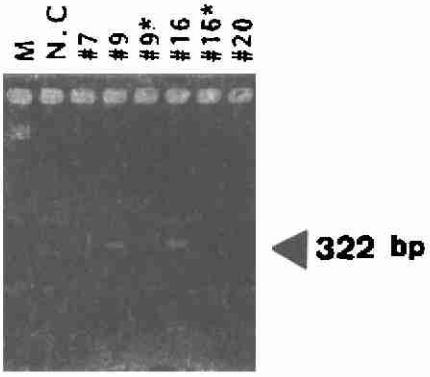


图 3　临床标本检测结果
M：分子量标准 123bp DNA Ladder
N.C：正常阴性对照
#7 和 #20　嵌套式 PCR 阴性
#9 和 #16　嵌套式 PCR 阳性
#9* 和 #16*　嵌套式同号标本 PCR-EB 阴性

2.4　动态检测观察

对同一例肺结核病患者在抗痨治疗前后 4 个时期中，分别作同份痰标本的涂片、培养和嵌套式 PCR 对比检测，治疗 3 个月后涂片、培养转阴，而嵌套式 PCR 仍为阳性，结果如表 3。

表 3　治疗前后各种检查结果对比

疗　程	治疗前	3 个月	6 个月	9 个月
痰涂片	+[1]	−[2]	−	−
培　养	+	−	−	−
嵌套式 PCR	+	+	−	−

1)"+"为阳性；　2)"−"为阴性

3　讨　论

随着分子生物学技术的发展，基因诊断技术在结核病细菌学诊断上得到应用，特别是 PCR 技术的建立，在基因水平上为结核病病原学快速、敏感、特异诊断开辟了新的途径。PCR 技术的关键之一是设计和人工合成目的基因片段序列两端互补的引物。本实验采用的引物由结核杆菌 37. 7u(38kDa)蛋白

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.ne

抗原 b (protein antigen b, Pab)DNA 序列衍生,结果显示,该寡核苷酸引物只扩增人型结核杆菌、牛型结核杆菌和 BCG 而不能扩增堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)和胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*) DNA。对在呼吸道感染中较常见的 5 株革兰阳性球菌,5 株革兰阴性杆菌均为阴性,无交叉扩增反应。

采用嵌套式 PCR 检测分枝杆菌 DNA,国外仅有个别报道,Pierre[4]认为内、外两对引物的复扩增,特异性并不减低。我们采用的嵌套式 PCR 中的内引物,亦为保守序列,其扩增的片段在第 1 步标准 PCR 扩增的特异片段之中,其特异性理论上是不受影响的。本实验中未出现假阳性或假阴性结果,亦证实了其高特异性。在实验整个操作过程,采取了一系列措施[5],避免可能发生的污染,保证结果的真实可靠。

嵌套式 PCR 比标准 PCR(PCR-EB)敏感度更为增高。标准 PCR 的敏感性低,可能的原因是在低数量的靶分子反应中,产生了非特异性的扩增产物。如扩增的人类 DNA 和引物二聚体与分枝杆菌 DNA 竞争[4],通过一对内引物特异性地再扩增第 1 次不完全扩增的结核杆菌 DNA,提高了 PCR 检测的敏感性。本实验结果显示,PCR-EB 最低检出度为 10pg DNA, 采用内、外两对引物的嵌套式 PCR 其最低检出度为 10 fg DNA,从而使敏感度增高了 1 000 倍。

PCR 法直接检测临床标本的结核杆菌,是研究的最终目的。在 72 份各种临床标本中,涂片镜检阳性者 9 份,培养阳性者 10 份,PCR-EB 阳性者 19 份,嵌套式 PCR 阳性者 26 份。PCR-EB 与嵌套式 PCR 检测结果经卡方检验有显著性差异($P<0.025$)。对同一例病人治疗前后不同时期的痰标本行嵌套式 PCR 检测,经抗痨治疗 3 个月后,虽然涂片镜检及培养均为阴性,但 PCR 检测结果仍为阳性,其原因为 PCR 可检出死结核杆菌中尚未变性的 DNA,故结果不受短期抗痨治疗的影响。

PCR 技术为结核病的诊断提供了一个快速、简便、有效的手段,其高特异性和高敏感性,使得极少量的结核杆菌得以检出,而且可以早期鉴别结核杆菌和非典型分枝杆菌感染,尤其适用于肺外结核,特别是结核性脑膜炎的快速诊断[6,7]。

(本研究承蒙日本长崎大学医学部第二内科原耕平教授,河野茂讲师和宫崎继义博士的热情帮助,特此致谢)

参 考 文 献

1 Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Molec Microbiol, 1989, 3: 843

2 庄玉辉, 李国利, 张小刚, 等. 脱氧核糖核酸聚合酶链反应快速检测结核临床标本中结核菌的评价. 中华结核和呼吸杂志, 1993, 1: 26

3 Andersen AB, Hansen EB. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b. a 38 000-molecularweight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1989, 57: 2481

4 Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, et al. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. J Clin Microbiol, 1991, 29: 712

5 Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature, 1989, 339: 237

6 Shanker P, Manjunath N, Mohan KK, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Neurology, 1990. 40: 1617

7 竹胁俊一, 永井良三. PCR 法にるさ抗酸菌の DNA 诊断. 医学のあゆみ, 1991, 158: 773

(1993-11-30 收稿 1994-10-28 修回)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

DETECTION OF DNA FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION

Zhang Tiantuo　Tang Yingchun　Zhang Kouxing
Long Weichao　Rao Xian

(Department of Internal Medicine, The 3rd Affiliated Hospital,
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

A technique of nested polymerase chain reaction (nested PCR) for the detection of DNA from mycobacterium tuberculosis was established. Two oligonucleotides were derived from a sequence which encodes a 37.7u (38k dalton) protein antigen b and used as primers for the amplification of DNA from 6 strains of mycobacterium as well as 10 strains of nonmycobacterium. By staining with ethidium bromide after electrophoresis in agarose gel, a specifically amplified 322 bp band was revealed in *M. tuberculosis*, *M. bovis* and BCG, but not in the rest. The sensitivity of the first and the second step PCR were as little as 10 pg and 10 fg of the target DNA respectively. Seventy-two clinical specimens were examinated for *M. tuberculosis* by microscopy, culture and PCR. The results showed that the nested PCR was the most sensitive, specific and rapid. The method can be applied to the early diagnosis of tuberculosis and extrapulmonary tuberculosis.

Subject headings　mycobacterium tuberculosis/genetics; polymerase chain reaction/methods; DNA/analysis

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.ne