

分枝杆菌 DNA 探针研究及应用概况

吴雪琼

(解放军 309 医院结核病研究室, 北京 100091)

随着分子生物学和基因工程技术的发展, DNA 探针得到充分的认识和广泛的应用, 为传染病的快速诊断、流行病学调查、食品卫生检验、肿瘤和人类遗传病的早期诊断等领域打开了一个新的突破口, 被认为是一种特异性强、灵敏度高、简便和快速的诊断技术。DNA 探针是能识别特异核苷酸序列的带标记的一小段单链 DNA 分子。它用于诊断主要是根据其基本的 DNA 双链化学结构。DNA 是两条单链核苷酸按照碱基互补的原则, 以氢键共价结合的双螺旋生物大分子。在一定条件下 (加热或碱处理), 双链 DNA 分子间的氢键断裂, DNA 变性而形成两条单链 DNA。而在另外的特定条件下, 变性的单链 DNA 又可重新恢复原来的双链结构, 这个过程就是 DNA 复性。两种来源不同的变性 DNA 分子之间只要存在互补的同源序列也可发生 DNA 复性作用。因此, 应用 DNA 探针进行诊断的主要方法是分子杂交, 即在适当的温度、离子强度和 pH 条件下, DNA 探针以氢键与单链的 DNA 或 RNA 形成稳定的 DNA:DNA 或 DNA:RNA 复合物。杂交的稳定程度取决于两条杂交链的互补序列。

结核病和其它分枝杆菌病传统的诊断方法灵敏度或特异性低, 而且烦琐费时。分枝杆菌 DNA 探针的研制及其应用为结核病的诊断及分枝杆菌的分类、鉴定提供了一种新方法, 在分子和基因水平上弥补了传统方法的不足。本文就分枝杆菌 DNA 探针的主要类型及其研究应用概述如下。

(一) cDNA 探针

以分枝杆菌核糖体核糖核酸 (γ RNA) 为模板, 通过反转录合成 cDNA, 而后标记成探

针。它与分枝杆菌 γ RNA 基因是互补的, 可与 γ RNA 杂交形成稳固的 DNA:RNA 双链复合物。 γ RNA 某些基因组存在于所有分枝杆菌中, 即在分枝杆菌属中同源性很高, 呈现交叉杂交反应; 而某些基因组随分枝杆菌属内种的不同而异, 具有种的特异性。Murphy 等^[1]发现与分枝杆菌中同源性高的 γ RNA 互补的 cDNA 探针与非分枝杆菌和真核细胞的 γ RNA 不杂交, 可用于检测分枝杆菌的存在, 鉴别分枝杆菌和非分枝杆菌。

与不同的分枝杆菌种特异的 γ RNA 互补的 cDNA 探针可用于分枝杆菌菌种鉴定和分枝杆菌病的诊断。目前国外普遍使用的是美国加利福尼亚圣地亚哥基因探针公司生产、销售的鸟分枝杆菌复合体快速诊断试剂盒和结核杆菌快速诊断试剂盒。前者含有两个 ^{125}I 标记的 cDNA 探针, 一个与鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*) γ RNA 互补, 另一个与胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*); 后者与结核杆菌复合体 [包括人型结核杆菌 (*M. tuberculosis*)、牛型结核杆菌 (*M. bovis*)、卡介苗 (*M. bovis* BCG)、非洲分枝杆菌 (*M. africanum*) 和田鼠分枝杆菌 (*M. microti*)] 的 γ RNA 互补。该公司应用这两个试剂盒检测了 41 属 92 种其它细菌及 30 种其它分枝杆菌 [不包括副结核分枝杆菌 (*M. paratuberculosis*)] 无交叉杂交。许多报道均证明了它们具有高度的灵敏度和特异性^[2-6]。Saito 等^[3]利用鸟分枝杆菌复合体快速诊断试剂盒检测该复合菌的不同血清型, 发现血清型 1—6、8—11 及 21 与鸟分枝杆菌的 cDNA 探针反应强 (杂交率 $\geq 33\%$), 而与胞内

庄玉辉主任为本文作了校核工作, 在此表示衷心的感谢。

分枝杆菌的 cDNA 探针反应极弱(杂交率 $\leq 2.1\%$),鉴定为鸟分枝杆菌;血清型 7、12—20 及 25 则与胞内分枝杆菌的 cDNA 探针杂交反应强($\geq 30\%$),与鸟分枝杆菌的 cDNA 探针杂交反应弱($\leq 3.5\%$),鉴定为胞内分枝杆菌。血清型 22—24 和 26—28 大致有三种情况:①血清型 26 和 28A 与胞内分枝杆菌 cDNA 探针呈强杂交;②血清型 22A、23、24A、28B 含有鸟分枝杆菌复合体的 a 抗原,与鸟分枝杆菌 cDNA 探针有微弱的杂交反应(4.9—7.2%);③血清型 22B 和 27A 含有瘰癧分枝杆菌(*M. scrofulaceum*)的 a 抗原,与上述两个 cDNA 探针都不杂交。由此可见,该试剂盒并不能鉴定所有血清型,还需建立其它 DNA 探针来鉴定这些不杂交的鸟分枝杆菌复合体^[3]。他们还测定了日本不同来源的鸟分枝杆菌复合体的构成百分率,发现患者、自然界和猪分离株中鸟分枝杆菌分别占 47、70 和 45%;胞内分枝杆菌分别占 53、30 和 55%;来源于患者的鸟分枝杆菌耐药性显著高于胞内分枝杆菌和来源于自然界的鸟分枝杆菌。但 Thoresen 和 Saxegaard^[7]的实验表明,鸟分枝杆菌和副结核分枝杆菌的 16S rRNA 具有很高的同源性,鸟分枝杆菌 cDNA 探针与绝大多数副结核分枝杆菌菌株杂交阳性,只有少数发生了遗传变异的菌株不杂交。因此该试剂盒无法区别这两个菌种^[7,8]。

cDNA 探针只能检测经过培养的临床标本,若直接检测 Bactec 培养的分枝杆菌比传统的培养方法节省时间,但其检测的灵敏度与分枝杆菌生长指数(GI)呈正相关,GI > 999,灵敏度为 100%;400 \leq GI < 999,灵敏度为 97.4%;GI < 400,灵敏度只有 30% 左右^[4,6]。

cDNA 探针主要用于液相杂交,其测定过程只需 2 小时即可完成。但在研究应用上也有其局限性。它是该公司的专利产品,目前可鉴定的菌种有限。要克隆新的特异探针还需经过反转录步骤,而且只能用于检测从培养菌中提取的 rRNA,不能直接检查临床标本中的分枝杆菌,从而限制了该类探针的进一步研究和推广应用。

(二) 总 DNA 探针

分枝杆菌总 DNA 被标记作为探针。由于不同属的 DNA 之间有 80% 以上的 DNA 序列不同,大多数不同种的 DNA 也有 30% 以上的 DNA 序列不同,因此应用该探针可鉴别分枝杆菌和非分枝杆菌,以及分枝杆菌属内 DNA 同源性低的菌种。

人型结核杆菌总 DNA 探针具有较高的灵敏度,可检测 0.1ng 的人型结核杆菌 DNA (其基因组的分子量约为 3×10^9 道尔顿),约相当于 2×10^4 个细菌;它也有较高的特异性,与 18 种主要分布于上呼吸道的非分枝杆菌(表 1)完全不杂交,^[9]与绝大多数分枝杆菌也不杂交(表 2),^[10]但与少数 DNA 同源性高的分枝杆菌^[11],如卡介苗(100% 同源性)、牛型结核杆菌(100%)、胞内分枝杆菌(50%)和堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)(33%),均有很强的交叉杂交,与鸟分枝杆菌(29%)等也有弱的杂交。杂交温度及 DNA 浓度对 DNA 杂交反应有一定的影响,提高杂交温度或降低 DNA 浓度,探针与同源性稍低的分枝杆菌如堪萨斯分枝杆菌、胞内分枝杆菌和鸟分枝杆菌的交叉杂交可减弱或消失。^[9,12,17]此外,人型结核杆菌有致病性,而卡介苗为非致病菌,鉴于两者 DNA 之间有 100% 同源性,可利用卡介苗 DNA 代替人型结核杆菌 DNA 作为探针进行检测^[10]。其它种(如鸟分枝杆菌复合体、戈登分枝杆菌)的总 DNA 探针同样具有较高的特异性^[10]。

DNA 斑点杂交不适用于大量标本的分析,尤其是在临床实验室开展有一定的困难。Bhattacharya 等^[12]建立了一种菌落杂交方法,即将培养的分枝杆菌菌落直接点在硝酸纤维膜上变性杂交。实验结果与 DNA 斑点杂交相似,但更适于临床进行菌型鉴定。我们的实验也证明了该方法是可行的^[13]。若与 Bactec 培养法联合应用,可将检测时间缩短到 2—39 天^[10]。

根据表型特征,通常认为瘰癧分枝杆菌(*M. scrofulaceum*)与鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌一起组成鸟-胞内-瘰癧分枝杆菌复合体。但 Hurley 等^[14]用瘰癧分枝杆菌和副结核分枝

杆菌总 DNA 探针进行杂交反应,显示瘰癧分枝杆菌 DNA 与鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、Wood pigeon bacillus (早期未归类为分枝杆菌)和副结核分枝杆菌同源性很低;而副结核分枝杆菌 DNA 与它们有很高的同源性。因此,若用总 DNA 探针鉴定,瘰癧分枝杆菌就不应与鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌一起组成复合菌,而应该是副结核分枝杆菌与其组成鸟-胞内-副结核分枝杆菌复合体; Wood pigeon

表1 与人型结核杆菌总DNA探针不杂交的非分枝杆菌

1. 厌氧消化链球菌 (*Peptostreptococcus anaerobius*)
2. 甲型链球菌 (*Alpha-streptococcus*)
3. 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)
4. 流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenzae*)
5. 上呼吸道奈瑟菌 (*Upper airways Neisseria*)
6. 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)
7. (*Legionella pneumophila*)
8. 白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)
9. 沙雷菌属 (*Serratia*)
10. 奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)
11. 肠杆菌属 (*Enterobacter*)
12. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)
13. 绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)
14. 克雷门杆菌属 (*Klebsiella*)
15. 梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*)
16. 光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*)
17. 星状诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*)
18. 口腔正常厌氧菌群 ("Normal anaerobic oral flora")

表2 与人型结核杆菌总 DNA 探针不杂交的分枝杆菌

1. 龟分枝杆菌 (*M. chelonae*)
2. 迪氏分枝杆菌 (*M. diernholeri*)
3. 杜瓦尔分枝杆菌 (*M. duvalii*)
4. 转黄分枝杆菌 (*M. flavescens*)
5. 偶发分枝杆菌 (*M. fortuitum*)
6. 胃分枝杆菌 (*M. gastri*)
7. 海分枝杆菌 (*M. marium*)
8. 草分枝杆菌 (*M. phlei*)
9. (*M. peregrinum*)
10. 须分枝杆菌 (*M. simiae*)
11. 耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*)
12. 土分枝杆菌 (*M. terrae*)
13. 次要分枝杆菌 (*M. triviale*)
14. 溃疡分枝杆菌 (*M. ulcerans*)
15. 牡牛分枝杆菌 (*M. vaccae*)
16. 蟾分枝杆菌 (*M. xenopi*)
17. 戈登分枝杆菌 (*M. goodii*)

bacillus 也应该被包括在该复合菌中,该菌很可能是副结核分枝杆菌的一个变种。

此外,用总 DNA 探针与分枝杆菌 DNA 限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP) 进行 Southern 印迹杂交即指印法 (finger print) 可鉴别不同的菌株。与噬菌体分型进行比较,两者具有同样的灵敏度,在菌株鉴别时可相互补充。Shoemaker 等^[15]曾用人型结核杆菌总 DNA 探针成功地鉴定了 15 株限制性内切酶 MboI 消化的人型结核杆菌临床分离株 DNA。但该方法产生的大量 DNA 片段较难判断。

总 DNA 探针的主要缺点是难于鉴别少数同源性高的分枝杆菌,以及分枝杆菌的培养、总 DNA 的提取都较麻烦、困难。

(三) 克隆的 DNA 探针

分枝杆菌总 DNA 经限制性内切酶消化后,利用基因工程技术进行重组、克隆,筛选出特异 DNA 片段标记形成的 DNA 探针。在诊断、鉴别诊断方面,它应该具有很高的灵敏度和特异性,而且具有取之不尽、用之不竭的 DNA 库。

Pao 等^[16]制备的人型结核杆菌克隆 DNA 探针 pTB2 和 pTB4 可检测 50pg 的结核杆菌 DNA,相当于 10^4 个菌细胞,与前两种 DNA 探针具有同样的灵敏度,可与显微镜检查的灵敏度相比拟 (10^4 菌细胞/ml 痰)。但迄今国内外报道的克隆 DNA 探针大多数特异性都不够理想^[15-18],只有少数克隆到分枝杆菌种特异的片段。如 Patel 等^[18]克隆的人型结核杆菌 PMTb4 和 PMTb5 探针,只与人型结核杆菌、牛型结核杆菌和卡介苗 DNA 杂交,不与鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌和瘰癧分枝杆菌杂交,可用于鉴别结核杆菌复合体和鸟分枝杆菌复合体。Huang 等^[19]报道的堪萨斯分枝杆菌 PMK1-9 DNA 探针只与海分枝杆菌 (*M. marinum*) 有微弱的交叉杂交。Collin 等^[20]克隆到副结核分枝杆菌高度特异的 DNA 片段 (0.22kb),它与其它 19 种分枝杆菌 (包括鸟分枝杆菌复合体) 不杂交。

一些分枝杆菌 DNA 同源性高达 80—

100%，单纯用 DNA 探针难以鉴别。用总 DNA 探针指印法鉴定将产生大量的片段，使判断较费劲；而用克隆 DNA 探针指印法鉴定产生的片段较少，很容易判断，克服了上述不足。如 Bhattacharya 等^[12]用人型结核杆菌 PL3 克隆 DNA^[21] 探针指印人型结核杆菌 DNA 产生一个 3.4kb 的片段，而牛型结核杆菌和鸟分枝杆菌都没有该片段。Zainuddin 和 Dale^[22] 用人型结核杆菌 A3/2 DNA 探针指印人型结核杆菌 DNA 出现多条带，牛型结核杆菌和卡介苗都只有简单的几条带。从而将人型结核杆菌总 DNA 探针和单用克隆 DNA 探针所不能鉴别的结核杆菌复合体的部分菌种区别开来。McFadden 等^[23]用副结核分枝杆菌 PMB22 克隆 DNA 探针指印副结核分枝杆菌有多条杂交带，鸟分枝杆菌血清型 2 和 5 只有 1 条带，而将 DNA 同源性达 90% 以上的副结核分枝杆菌和鸟分枝杆菌复合体区别开来。这在临床上只有意义，因为鸟分枝杆菌只是环境中的机会致病菌，而副结核分枝杆菌却是引起人类和动物克隆氏病的致病菌。Hampson 等^[24]用副结核分枝杆菌 pMB16, pMB17, pMB20 和 pMB22 四种探针指印法对鸟分枝杆菌复合体的部分血清型进行分析，将它们归为不同的 RFLP 型，如血清型 1、3、8、9 和 28 为 RFLP 型 A；血清型 5 为 RFLP 型 C；血清型 16 为 RFLP 型 D，血清型 10 为 RFLP 型 G，这有益于流行病学调查。

克隆 DNA 探针的研制还没有取得突破性的进展，主要原因在于分枝杆菌分子生物学的研究才刚刚起步，其遗传背景还不清楚，分枝杆菌基因的克隆带有很大的盲目性和机遇性。只有对分枝杆菌的基因图谱以及它们在发病机理中所起的作用有了清楚的了解，才可能有目的地克隆基因片段，分枝杆菌分子生物学才能突飞猛进地发展。

(四) 合成的 DNA 探针

根据已知的分枝杆菌特异序列用 DNA 合成仪有目的地合成一条寡聚核苷酸链，经标记后所形成的 DNA 探针。它主要用于聚合酶

链反应 (PCR) 扩增产物的检测，其应用情况详见《应用 PCR 检测分枝杆菌的若干进展》一文（即将发表于《中国防痨杂志》1992 年第 1 期）。它虽然克服了 DNA 克隆的盲目性和机遇性，但所有分枝杆菌的整个基因图谱尚不清楚，所合成的 DNA 序列也只能是根据克隆 DNA 的序列分析。

结 语

上述四种探针除 cDNA 探针有商品销售外，其余三种还处于实验室研究应用阶段，使 DNA 探针研究一度停滞不前。影响其广泛推广应用的主要原因是：(1) 直接检测未培养临床标本中分枝杆菌 DNA 的灵敏度不够理想。(2) 采用放射性同位素标记，其价格昂贵，半衰期短，存在污物处理问题，对人体有害。(3) 特异性有待提高。(4) 只有少数菌种的探针。近几年，随着 PCR、DNA 合成技术及非同位素标记方法的推广，为 DNA 探针的应用打开了一个新的局面。临床标本不需经过培养，只需通过 PCR 扩增标本中特异的 DNA 或 rRNA 片段，然后再用非同位素标记的 DNA 探针进行检测，其灵敏度和特异性大大提高，方法简便易行，达到了快速诊断的目的，并能够在临床实验室广泛开展。今后还需继续分析几种主要致病性分枝杆菌的染色体基因序列，克隆其特异的 DNA 片段作为探针；同时建立与分枝杆菌毒力、药物抗性等测定有关的杂交探针，为临床直接提供更多准确而有价值的资料，成为临床医生结核病诊断、治疗的指南。

参 考 文 献

1. Murphy K A et al.: Abstract of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, p. 122, 1986.
2. Drake T A et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 25(8): 1442—1445, 1987.
3. Saito H et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 27(5): 994—997, 1989.
4. Kiehn T E and Edwards F F: *J. Clin. Microbiol.*, 25(8): 1551—1552, 1987.
5. Musial C E et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 26(10): 2120—2123, 1988.

(下转第 221 页)

6. Body B A et al.: *A. J. C. P.*, 93(3): 415—420, 1990.
7. Goodwin CS et al.: *J. Infect Dis*, 155: 488, 1987.
29(3): 625—626, 1991.
8. Bottger E C: *J. Clin. Microbiol.*, 29(11): 2360—2361, 1991.
9. Shoemaker S A et al.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, 131: 760—763, 1985.
10. Roberts M C et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 25(7): 1239—1243, 1987.
11. Baess I: *Acta Pathol. Microbiol. scand., Sect B*, 87: 221—226, 1979.
12. Bhattacharya S et al.: *India J. Med. Res.*, 37(2): 144—150, 1988.
13. 吴雪琼等: *微生物学报*, 30(3): 234—237, 1990.
14. Hurley S S et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38(2): 143—146, 1988.
15. Shoemaker S A et al.: *Am Rev. Respir. Dis.*, 134: 210—213, 1986.
16. Pao C C et al.: *Tubercle*, 69: 27—36, 1988.
17. Cohen M L et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 25(7): 1176—1180, 1987.
18. Patel R J et al.: *Rev. Infect. Dis.*, 11(sup. 2): 411—419, 1989.
19. Huang Z H et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 29(10): 2125—2129, 1991.
20. Collins D M et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 28(7): 1591—1596, 1990.
21. Bhattacharya S et al.: *J. Biosci.*, 10(2): 277—281, 1986.
22. Zainuddin Z F and Dale J. W.: *J. Gen. Microbiol.*, 135: 2347—2355, 1989.
23. McFadden J J et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 25(5): 796—801, 1987.
24. Hampson S J et al.: *Lancet*, 14(1): 65—68, 1989.