

技术与方法

应用 PCR-SSCP 快速鉴定结核分枝杆菌复合群

李洪敏 吴雪琼 张俊仙 王 巍 程红群

(解放军三零九医院结核中心实验室 北京 100091)

摘要: 通过聚合酶链反应(PCR)-单链构象多态性(SSCP)技术分析结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌临床株的 16S rDNA 基因。60 例临床标本中,20 例为阳性,与传统方法比较无差异。其中分型:18 例为结核分枝杆菌,2 例为结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌双重感染。20 例阴性标本中,PCR-SSCP 又检查出 5 例阳性。20 例对照标本中,3 种传统方法与 PCR-SSCP 法均检测为阴性。全部试验 3d 报告结果。结核分枝杆菌复合群和卡介苗的图形相同以外,其它分枝杆菌的 PCR-SSCP 电泳图谱均有差异。所以,应用 PCR-SSCP 技术快速鉴定结核分枝杆菌是可行的。

关键词: 聚合酶链反应(PCR),单链构象多态性(SSCP),结核分枝杆菌复合群

中图分类号: Q93 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0202-03

FAST DIFFERENTIATION OF MYCOBACTERIAL SPECIES BY USING PCR-SSCP

LI Hong-Min, WU Xue-Qiong, ZHANG Jun-Xian, WANG Wei, CHENG Hong-Qun

(PLA 309 Hospital, Beijing 100091)

Abstract: Methods Using PCR-SSCP analysis the 16S rDNA of mycobacterial species. In sixty clinical specimen, twenty were positive by using both traditional methods and PCR-SSCP. In these twenty species, eighteen were *M. Tuberculosis* and two were infected by both mycobacterial species and other than mycobacterium tuberculosis. Five of twenty species which were negative by using traditional methods were positive by using PCR-SSCP. All methods showed negative in twenty control species. All experiments reported results in three days. Using PCR-SSCP, there were different profiles in different mycobacterial species, except that there were similar profiles in mycobacterial and *M. bovis* BCG. It can be used to differentiate mycobacterial species by using PCR-SSCP.

Key words: Polymerase chain reaction, Single-stranded conformation polymorphism, Mycobacterial species

鉴定结核分枝杆菌复合群与其他非结核分枝杆菌的区别,最普遍的方法是培养、染色、菌型生化鉴定,比较费时费力,快速特异鉴定结核分枝杆菌复合群,成为病原微生物领域中迫切需要解决的重要课题。本研究应用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)^[1]技术,分析 16S rDNA 123-275 位核苷酸片段是原核生物特定变异的区域^[2],由于不同型结核分枝杆菌的 PCR 产物聚丙烯酰胺泳动速度不同,从而呈现出不同的

PCR-SSCP 图谱,可以快速鉴别不同型的分枝杆菌,此方法有可能成为一种新型分子菌种鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

结核杆菌标准菌株系中国药品生物制品鉴定所提供,临床标本系我院已确诊为肺结核的住院病人痰液

收稿日期:1999-02-16,修回日期:1999-05-05

标本,经 L-J培养、匡氏培养基、BACTEC-960全自动结核快速培养和抗酸染色阳性标本 20 例;阴性标本 20 例;非结核对照 20 例(系我院内科确诊为支气管病的患者)共 60 例标本,经 BACTEC-960 培养后,进行提取 DNA,放入 -20°C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增: 试剂系三零九医院结核病研究室研制的 16S rDNA PCR 扩增试剂盒, (上游 5' CAA GTC GAA CGG AAA GCT CT3', 下游 5' GCC GTA ATCT CAG TCC GAG TG3'), 浓度为 $0.4\mu\text{mol/L}$, 可扩增 16S rDNA 21-292 位碱基, 产生 272bp 片段。在 $25\mu\text{L}$ 反应体系中, $4\times$ dNTP 的终浓度为 0.2mmol/L , 纯化的 DNA 模板 $10\sim 100\text{ng}$, TaqDNA 聚合酶 1U。至 DNA 热循环仪按 94°C 变性 50s - 58°C 退火 1min - 72°C 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后在 72°C 延伸 7min。取 $3\mu\text{L}$ 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳检测扩增产物。

1.2.2 SSCP 分析: 将分离株与结核分枝杆菌标准株的 16S rDNA PCR 扩增产物加在同一块 (29:1) 非变性聚丙烯酰胺凝胶中于 4°C 冰箱 120V 电泳 6h, 银染色或溴化乙锭染色后观察结果并照相。

1.2.3 结果判定: 与结核分枝杆菌标准株图谱相似的分离株即可判定为结核分枝杆菌复合群, 否则为非结核分枝杆菌。

2 结果与分析

经 3 种方法培养均可培养出结核杆菌的 20 例标

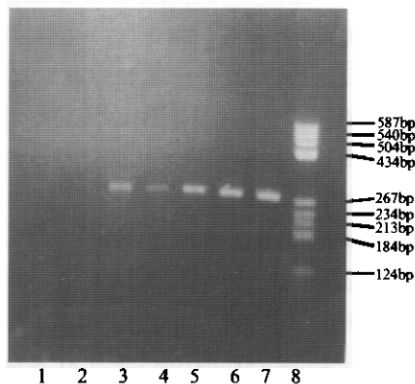


图1 临床标本 16S rDNA 扩增结果

1~2 为阴性株, 3~6 为结核杆菌株,
7 为结核杆菌标准株, 8 为 PBR
322-HaeIII 分子量人型标准株

本, PCR 扩增均为阳性 (见图 1 泳道 No. 3~6)。PCR-SSCP 进一步分析有 18 例为结核分枝杆菌 (见图 2 泳道 No. 1~3, 5~6), 还有 2 例既有结核杆菌的图形又有非典型结核分枝杆菌复合型 (见图 2 No. 4)。

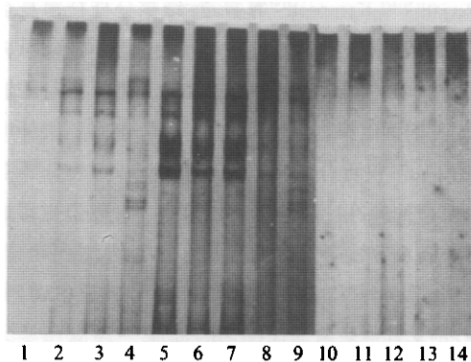


图2 部分临床标本 SSCP 电泳图谱

1~3, 5~6 为结核杆菌株, 4, 9 为结核杆菌和非结核分枝杆菌复合型, 10~14 为阴性株, 8 为标准株

在 20 例培养和抗酸染色均无结核分枝杆菌的标本中, PCR-SSCP 还扩增出 5 例阳性标本, 其中有 3 例是结核杆菌, 还有 2 例是混合感染型 (见图 2 泳道 No. 9), 与其他 3 种培养方法比较, 经 T 检验统计差异显著, $P < 0.05$ 。

有 20 例非结核对照组, 3 种培养方法培养均为阴性, PCR-SSCP 法也均为阴性, (部分结果见图 2 泳道 No. 10~14)。全部试验 3d 完成。

3 讨论

长期以来, 人们一直在不断地探索新的简便、快速、灵敏、特异的结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌菌型鉴定方法。除传统方法外, BACTAC-960 法以快速培养结核分枝杆菌 (需 2~6d) 的优势, 在国内外已成为结核病诊断的标准参照系统之一。但美中不足的是其液体培养基价格昂贵, 且不能鉴别结核杆菌复合群和非结核杆菌复合群。近年来建立的色谱方法, 需特殊仪器, 难以在普通实验室推广使用。核酸探针技术又不能完整鉴别两种复合群, PCR-限制性片段长度多态性 (RFLP) 需用多种限制性内切酶消化, 且重复性欠佳; PCR-DNA 测序法能可靠地确定分枝杆菌种特异性核苷酸序列, 但测序费用较高, 需有测序仪器, 故未能在临床上推广使用。

PCR-SSCP 分析技术已成为较为广泛应用的方法之一。目前许多分枝杆菌 16S rDNA 序列已测定。约

含 1500 个核苷酸,序列是高度保守的,不同种的分枝杆菌的序列相似性水平很高,说明它们是亲缘关系密切的一群细菌,只是在某些位置上有少数核苷酸变化,而这些核苷酸变化的位置是分枝杆菌种或型特异的。根据 Rogall^[1]和 Kempse^[4]等报道:结核分枝杆菌复合群 16S rDNA 在 123~276 位碱基是完全相同的,而与其它 22 种非典型分枝杆菌相比存在 1 到数个碱基的差异,故我们可以根据其空间构象不同,鉴别不同的菌型(如图 1),不仅可分析出人型结核杆菌,还可分析多重感染菌型的存在。因 PCR-SSCP 方法对死菌也可进行分析故其灵敏性高于传统培养的方法,从对照组分析,与传统方法相同均未出现假阳性,说明 PCR-SSCP 特异性强,不受其他杂菌干扰(见图 1,2)。

对于临床难治,复治结核病人疗效不佳,很重要的原因之一是患者有结核和非结核分枝杆菌的混合感染,应用 PCR-SSCP 方法能及时、简便、快速地进行菌型鉴定,对于指导难治、复治结核病有效化疗具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] WU XQ, ZHANG J, ZHUANG Y *et al.* Chinese Medical Journal, 1999, 112(6): 524~528.
- [2] Suzuki y, Nagata A, Ono Y, *et al.* J Bacteriol, 1988, 170: 2886~2889.
- [3] Rogall T, Fiohr T, Bottger E C. Gen Microbiol, 1990, 136: 1915~1920.
- [4] Kempse^[4] K E, JIYE, Estrada-GICE *et al.* J Gen Microbiol, 1992, 138: 1717~1727.