

应用 PCR 扩增对分枝杆菌分类鉴定及标本检测的研究

张灵霞 庄玉辉

(解放军 309 医院结核病研究室 北京 100091)

摘要:用对结核分枝杆菌特异性很强的引物 b 对 21 种分枝杆菌和 13 种非分枝杆菌进行 PCR 扩增,并对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。结果表明:受试菌种用引物 b 在退火温度 61 C 时,扩增的敏感性为 50fg,且只能扩出结核分枝杆菌、胃分枝杆菌,且他们扩增片段的分子量也不相同。可见,用引物 b,必要时辅以引物 a,对分枝杆菌 16S~23S rDNA 间隔区序列进行扩增,可以快速有效地鉴定分枝杆菌临床分离株,是分枝

收稿日期:1998-12-06,修回日期:2000-06-25

杆菌鉴定的一种新方法。

关键词:分枝杆菌,鉴定,PCR

中图分类号:R52 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2001)01-055-04

THE STUDY ON DIFFERENTIATION AND DETECTION OF MYCOBACTERIUM SPECIES BY PCR AMPLIFICATION

ZHANG Ling-Xia ZHUANG Yu-Hui

(Tuberculosis research lab. 309hospital, Beijing 100091)

Abstract: Using the prime b (special to *M. tuberculosis*) to amplify 21 *mycobacterium* and 13 nonmycobacterium, the products amplified were detected by agarose gel electrophoresis. The sensitivity was 50fg at annealing temperature 61 C, and only *M. tuberculosis*, *M. gastri* were amplified, those results showed: the clinical isolated *mycobacterium* can be differentiated and detected quickly and efficiently by using the prime b (using the prime a when necessary) to amplify 16S~23S rDNA spacer sequence of *mycobacterium*.

Key words: *Mycobacterium*, Differentiate, PCR

前文^[1]我们用 Lappayawichit 等^[2]报道的保守性很强的引物 a 对 21 种分枝杆菌和 13 种非分枝杆菌标准株的 16S~23S rDNA 间隔区序列 DNA PCR 扩增,聚丙烯酰胺凝胶电泳,限制性片段长度多态性进行了系统的研究。并对结核分枝杆菌 H37Rv、牛分枝杆菌、BCG、堪萨斯分枝杆菌、胞内分枝杆菌、草分枝杆菌 6 种分枝杆菌的扩增产物进行了序列测定。根据测序的结果,选择碱基的差异性设计了对结核分枝杆菌 H37Rv 特异性很强的引物 b。在结核病临床标本中,最常见的是结核分枝杆菌,因此,本文对引物 b,必要时辅以引物 a 对分枝杆菌临床分离株的鉴定价值进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源:受试的 21 种分枝杆菌来自中国药品生物制品检定所;受试的 13 种非分枝杆菌来自中国科学院微生物研究所^[3]。

1.1.2 引物:引物 a:5'-GAAGTCGTAACAAGG,5'-CAAGGCATCCACCAT 根据文献^[2]报道设计,由赛百胜生物工程公司合成和纯化。引物 b:5'-CAGCAAACGCCCCAAC-TG,5'-CG-GCAGCGTATCCATTGATG,根据测序结果^[4](与国外文献报道仅有 1 个碱基的差别),选择碱基差异性而设计的,由赛百胜生物工程公司合成和纯化。

1.1.3 标本收集:96 例结核病人痰标本来自本院结核科住院病人,经 X 线照像、临床表现确诊。30 例非结核病人痰标本来自本院呼吸科、肿瘤科及北医三院呼吸科住院病人。

1.1.4 仪器及试剂提供:DNA Marker 和限制性核酸内切酶购自华美生物工程公司;溴化乙锭购自同正生物技术发展公司。

1.2 方法

1.2.1 标本 DNA 提取:采用本室自制的标本前处理试剂盒。

1.2.2 PCR 扩增:参照本室设计的 25 μ L 扩增体系并稍作改进,扩增产物做 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外检测。

2 结果

2.1 引物 b PCR 扩增的敏感性

将纯化的结核分枝杆菌 H37Rv 株 DNA 稀释成 $5\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $500\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $50\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $5\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $500\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $50\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $5\text{fg}/\mu\text{L}$ 。25 μL PCR 扩增体系取稀释好的 DNA 溶液各 2 μL ，用引物 b 在退火温度 61 $^{\circ}\text{C}$ 下扩增，敏感性为 $50\text{fg}/\mu\text{L}$ 。

2.2 引物 b 对分枝杆菌扩增特异性

用引物 b 在退火温度 61 $^{\circ}\text{C}$ 下，对 21 种分枝杆菌和 13 种非分枝杆菌标准株进行扩增，除结核分枝杆菌 H37Rv、胃分枝杆菌外，其它受试各菌种扩增均为阴性。说明引物 b 对结核分枝杆菌特异性较强，这对于临床分离株的快速鉴定有实用价值(图 1)。

2.3 引物 b 对结核病人痰标本的检测

用引物 b 对 96 例结核病人痰标本(52 例涂阳, 44 例涂阴)进行 PCR 扩增。凡 PCR 扩增阳性的标本, 其扩增条带与结核分枝杆菌 H37Rv 参考株相同, 为 250bp。96 例结核痰标本 PCR 阳性率为 73.9%, 其中, 52 例涂阳标本有 49 例扩增阳性, 3 例扩增阴性(可能因为痰中有抑制 PCR 扩增的因素存在); 44 例涂阴标本有 22 例扩增阳性。而 30 例非结核病人临床标本扩增结果全为阴性(图 2)。

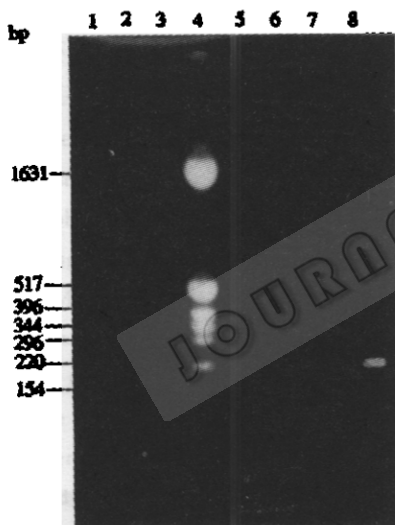


图 1 引物 b PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

- 1 胞内分枝杆菌, 2 海鱼分枝杆菌, 3 堪萨斯分枝杆菌,
4 Marker (PBR322/HinfI), 5 猿猴分枝杆菌, 6 BCG,
7 牛分枝杆菌, 8 结核分枝杆菌 H37Rv

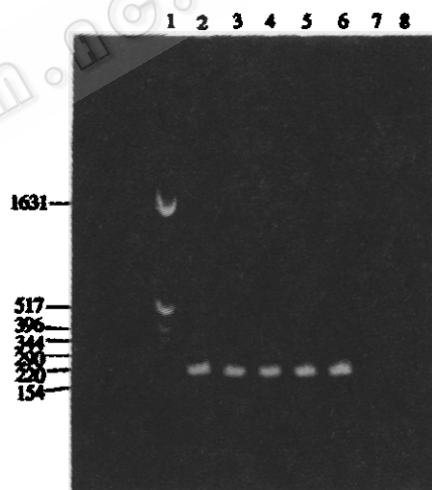


图 2 引物 b PCR 扩增对临床标本的检测

- 1 Marker (PBR322/HinfI), 2~4 涂阳标本,
5~6 涂阴标本, 7~8 非结核标本

3 讨论

由于分枝杆菌生长缓慢, 许多传统的分类鉴定方法又是根据细菌表型特征采用综合指标来判定的。有时还需要亚培养, 一般需 1~2 个月, 这对于临床诊断是不利的, 故寻找快速、敏感的菌种鉴定方法是很必要的。而 16S~23S rDNA 间隔区序列由于具有普遍性和高变性, 应用于菌种分类鉴定具有优越性。

在前面的研究中, 用引物 a 对 21 种分枝杆菌和 13 种非分枝杆菌进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳和 RFLP 分析, 分枝杆菌的琼脂糖凝胶的条带一般有 1~2 条, 非分枝杆菌有

1~3条。在被试的15种缓慢生长分枝杆菌中12种菌种(80%)的扩增片段集中在340~400bp之间,快速生长分枝杆菌则集中在470~575bp之间。单从琼脂糖凝胶电泳上只能鉴定6种分枝杆菌和8种非分枝杆菌,鉴别率为42%。RFLP分析结果显示被试的8种非分枝杆菌中除了3种有单酶切位点外,其它菌株均没有这两种酶的酶切位点;而分枝杆菌中结核分枝杆菌、BCG、牛分枝杆菌、猿猴分枝杆菌谱型完全相同,其他菌种均有区别,能鉴定开,即能鉴定86%的受试菌种,而引物b特异性很强,受试菌种中只有结核分枝杆菌、胃分枝杆菌扩增阳性,根据上述研究结果,提出临床分离株的鉴定程序:引物b,61C以结核分枝杆菌H37Rv为对照,用PCR扩增-琼脂糖凝胶电泳,初步区分结核分枝杆菌与其它分枝杆菌及非分枝杆菌;必要时辅以引物a,退火温度45C PCR扩增-其产物经HaeIII或MSP I多态性分析。

从1989年法国Hance, A. J.^[5]等报告用PCR技术检测临床标本中分枝杆菌其敏感性少于100个菌以来,各国相继报道类似文章一百多篇^[6,7]。大多数检测结核分枝杆菌的引物只能将结核杆菌复合菌群与其它分枝杆菌区别开,而不能区别其所包含的各个菌种。本文所设计的引物b只能扩增结核分枝杆菌复合菌群的结核分枝杆菌,特异性提高。直接检测结核临床标本的阳性率为73.9%,与IS6110的引物INS1、INS2的扩增阳性率基本相同(67.7%)。在操作过程中注意防止交叉污染,分别在不同的实验室进行DNA提取,PCR扩增与产物检测;对所用试剂进行分装和高压灭菌,对30例非结核病人痰标本进行扩增,结果全部为阴性,假阳性率为0。

16S~23S rDNA 间隔区序列分析应用于分枝杆菌分类鉴定3d即可报告结果,具有快速简便的优点。但它作为一种新的基因诊断技术,其研究还刚刚起步,需要不断改进完善操作方法和实验条件,以便为分枝杆菌的分类,为结核病的早期诊断和鉴别诊断提供依据。

参 考 文 献

- [1] 张灵霞,庄玉辉,张小刚,等. 中国现代医学杂志,1999,9(12):35~37.
- [2] Lappaywichit p, Rientong S, rientong D, *et al.* Tubercle and Lung disease, 1996, 77: 257~263.
- [3] 张灵霞,庄玉辉. 中华微生物和免疫学杂志, 2000, 20(4): 312~315.
- [4] 张灵霞,庄玉辉. 防痨信息, 2000, 1: 31~35.
- [5] Hance A J, Hermans P. Molecular microbiol, 1989, 3: 843~846.
- [6] 庄玉辉,吴雪琼,李国利,等. 中华结核和呼吸杂志, 1994, 1: 36~39.
- [7] Hartskeerl R A, Vary P, Shankar P, *et al.* J. Gen. Microbiol. 1989, 135: 2357~2359.