

DNA RFLP 分析在分枝杆菌鉴定中的若干进展

张灵霞 庄玉辉

(解放军三零九医院结核病研究室 北京 100091)

迄今报道可知,从人、动物以及自然界中分离出的分枝杆菌达100多种,其中大部分是腐生菌,一部分对人、动物有致病性,它们主要是通过呼吸道,还可以经过消化道、破损的皮肤粘膜等多种途径进入机体,侵犯多种组织器官,特别是肺脏。结核分枝杆菌引起结核病(肺结核),非结核分枝杆菌中有少数菌对人、对动物的致病性,其临床表现、体征与X线影像酷似结核病,但在诊断与治疗以及流行病学的意义上显然各具特点。分枝杆菌与相关的菌属又有相似性。所以菌种鉴定对于结核病的临床和流行病学是至关重要的。本文简要介绍DNA限制性片段长度多态性(RFLP)分析在分枝杆菌分类、鉴定研究中的若干进展。

1 染色体基因组DNA RFLP分析在分枝杆菌分类、鉴定中的应用

生物学及细胞生化试验一直是菌种鉴定的经典方法。用于分枝杆菌鉴定的经典方法有:(1)培养特性,(2)细胞生化实验,(3)鉴别培养基等。相当多试验项目操作繁杂,或敏感性低,特异性差,尤其是培养耗时长,约4~8周,影响临床早期诊断。近几年陆续报道了若干新的检验、鉴定技术:

1.1 核酸探针杂交法: DNA或RNA探针杂交能鉴定几乎所有临床分离的结核分枝杆菌、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌^[1,2]。这是一种快速可靠的菌种鉴定方法,由于分枝杆菌属的菌种DNA同源性较高,因此该技术只能用于部分分枝杆菌的鉴定。

1.2 枝菌酸的高效液相色谱(HPLC)或者分枝杆菌类脂的薄层层析。它是由Bulter和Kilburn发展起来的一种菌种鉴定系统^[3]。它鉴定9种分枝杆菌的准确率是98%^[4],但是HPLC设备比较贵,难以在一般临床实验室推广,而且上述两种方法仍需纯培养物,需时间较长,一般2~4周。

1.3 近年来报道了一些直接检测病人标本中分枝杆菌的基因扩增方法,即PCR扩增技术^[5,6]。使用特异性强的引物具有菌种特异性,对于结核病的快速、特异诊断

显示出它的优点,但难于应用在大部分分枝杆菌菌种的鉴定。

1.4 DNA限制性片段长度多态性分析是近几年来发展的一种DNA分析技术,它可用于细菌分类与菌种鉴定。在分枝杆菌菌种鉴定中的应用可分为以下几种主要类型:

(1)对染色体基因组DNA用限制性内切酶消化,电泳,分析谱型。这种方法形成区带较多,可将分枝杆菌分成几个大群,在分类上具有一定的意义,并有一定的学术价值。但难于鉴定到种的水平,而且不同内切酶,不同来源的菌株及不同的显色方法形成的谱型均不完全相同^[7],其临床应用价值不高。

(2)染色体基因组DNA经限制性内切酶消化,其消化产物与特定探针进行southern blot杂交,并分析其RFLP谱型特点。常用探针一般有RNA探针、cDNA探针、寡核苷酸探针和基因组插入序列。其中最常用的探针是基因组插入序列(Insertion Sequence, IS)。插入序列是最简单的一种转座子成分,只含有少数与自身转座有关的基因和两端的反向重复序列。它可在特定基因组内复制,转移。不同菌种插入序列的种类和数目及其在染色体中的位置均不完全相同,所以,用插入序列做探针可用于菌种分类和鉴定。据报道,用于分枝杆菌菌种鉴定的插入序列探针基本上有:

a. IS3插入序列家族,包括IS6110和IS986^[8,9], IS6110和IS986仅在末端重复序列相差2个碱基。均可用于鉴定结核分枝杆菌复合菌群,从不同病人分离到的结核分枝杆菌中IS6110具有很高的多态性,对结核分枝杆菌流行病学监测具有重要意义。IS6110亦可用于鉴定偶然分枝菌,与*E. coli*插入序列IS3411具有同源性^[10]。

b. IS900是含有1451个碱基的插入序列,它缺乏末端反向重复序列和正向重复序列,在副结核分枝杆

菌中含有10~15个拷贝,因而它主要用于鉴定副结核分枝杆菌^[11]。

c. IS987含有1485个碱基的插入序列,它只存在于结核分枝杆菌复合群的 *M. bovis*^[12],而IS3家族只能鉴定到结核分枝杆菌复合菌群。

d. 在鸟-胞内分枝杆菌复合菌群中共有5种插入序列: IS901、IS1110、IS11141、IS1245、IS1311。其中IS901、IS1110、IS1245和IS1311都可用于鉴定鸟型分枝杆菌,但它们并不属于同一家族。IS1110具有1457个碱基,它缺乏末端反向重复序列,与副结核分枝杆菌的插入序列IS900具有相关性。而IS901含有1472个碱基,具有一个开放的读码框架,可编码401个氨基酸,它与 *Streptomyces davuligerus* 的插入序列IS116具有相关性。IS1245具有1313个碱基,可编码转位酸,与 *M. bovis* 的插入序列IS1085具有同源性。用IS1311作探针,鸟型分枝杆菌形成A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、O、P、Q、R等多种谱型^[13,14,15]。IS1141存在于胞内分枝杆菌。

e. IS6120是一个含有1500个碱基的插入序列,它具有24个碱基的末端反向重复序列,插入基因组靶序列后产生正向重复,它在耻垢分枝杆菌中至少有3个拷贝,而且只存在于耻垢分枝杆菌中,因此可用于鉴定耻垢分枝杆菌^[16]。

f. IS1081存在于结核杆菌复合菌群,应用IS1081作探针与经过 *pvuII* 限制性内切酶消化的基因组DNA进行杂交,结核杆菌复合菌群可形成A、B、C、D、E、F、G七种谱型。不同菌种谱型不同,结核杆菌、牛分枝杆菌主要是谱型A,BCG则全是谱型G。而且含有8.0kb *pvuII* 片断的谱型G仅存在于BCG中,可用于快速鉴定BCG^[17]。

这种方法能鉴定到种,但每一种探针只能应用到少数几种甚至只有一种分枝杆菌的鉴定,而且探针的制备过程较繁杂,临床应用价值仍然不高。

2 16s rDNA 和 23s rDNA 间隔序列 RFLP 分析在分枝杆菌鉴定中的应用

这一技术的原理是通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增DNA的一个特定序列,然后对该序列PCR扩增产物用限制性内切酶进行消化分析比较酶切片段的长度和数目,从而对菌种进行鉴定。据 Boris Boddinhaus 报道^[18],16S rDNA具有属特异性序列和种特异性序列,利用不同的引物进行扩增,再对扩增的产物进行限制性内切酶消化,可

以鉴定到属、种不同水平^[18]。Steingrubt 等报道^[19]对65kd 热休克蛋白基因进行PCR扩增,可扩增出一条439bp的片段,经限制性内切酶 *HaeIII*、*BstXI* 消化后产生3~4条片段,能够用于分枝杆菌的鉴定^[19]。它们的优点是快速,能鉴定部分菌到种,但所得区带数目少,信息量小,而且在临床实验室作常规操作比较困难。

近几年来人们发现,不同菌种16S~23S rDNA 间隔序列两端都具有分别与5'-GAAGTCCAAGG和5'-CAAGGCATCCACCGT互补的极端保守的碱基序列。间隔序列本身由于所含tRNA的数目和类型不同,具有长度和序列上的多态性,而且比16S rDNA 本身来说具有更强的高变性,因而可作菌种鉴定的一种方法。1993年 Jensen 等利用该方法对 *L. Monocytogenes*、*S. typhimurium*、*C. freunelli*、*P. vulgaris* 等28种细菌进行了鉴定^[20]。1996年, Lappayawichit 等又通过PCR扩增16S~23S rDNA 间隔序列,并对扩增产物的 *BstXI*、*MspI*、*HaeIII* 限制性内切酶消化的酶切图谱分析,对几种分枝杆菌进行了鉴定。据其报道快速生长分枝杆菌能扩增出1~2条分子量在420bp和520bp之间的区带,而缓慢生长分枝杆菌则仅能扩出一条带。带的大小在325到370bp之间^[21]。因而通过扩增产物可直接鉴定快速生长分枝杆菌和缓慢生长分枝杆菌。而大部分分枝杆菌16S~23S rDNA 间隔序列PCR扩增产物酶切图谱均不相同。可鉴定大部分分枝杆菌到种的水平,不失为菌种鉴定的一种新的方法,但其研究刚刚起步,国外仅见一篇报道,国内尚未见报道。其扩增的敏感性和特异性,其它限制性内切酶酶切图谱,同种分枝杆菌临床分离株敏感株与耐药株16S和23S rDNA 间隔序列的差别,其在临床标本检测中的应用都有待于进一步的研究。

3 展望

近几十年来,生物学及细胞生化实验一直是分枝杆菌菌种鉴定的经典方法,这些传统的分类、鉴定方法具有局限性:耗时长,操作繁杂、敏感性低,特异性差,常常又需要综合指标来判定。影响临床早期诊断。

近十几年来,分子生物学技术如DNA探针、PCR扩增等在分枝杆菌分类、鉴定上得到应用,具有快速、简便的优点。但所得信息量少,而且分枝杆菌种类多,很难鉴定到种的水平。

近几年来,国外有报道,对分枝杆菌16S和23S rDNA 间隔序列进行PCR扩增,并对扩增产物进行限制性内切酶消化来鉴定分枝杆菌。这种方法快速、简便、

灵敏性高,多数分枝杆菌能鉴定到种的水平。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、鉴定,为分枝杆菌的早期、快速诊断与鉴别诊断提供依据。

参 考 文 献

- [1] Kohne D E. *Adv Exp Med Biol*, 1990, **263**: 11~35.
- [2] Musial C E, Tice L S, Roberts G D. *J Clin Microbiol*, 1988, **26**: 2120~2123.
- [3] Butler W R, Kilburn J O. *J Clin Microbiol*, 1988, **16**: 50~53.
- [4] Butler W R, Jost K C, Kilburn J O. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**: 2468~2472.
- [5] Brisson Noel, Gicquel A B, Lecossier D et al. *Lancet*, 1991, **11**: 69~1071.
- [6] Eisenach K D, Cave M D, Bates J H et al. *J Infection Dis*, 1990, **161**: 977~981.
- [7] Steven A, James H, Wilbur D et al. *AM REV Respir Dis*, 1986, **134**: 210~213.
- [8] Dominique T, Anne B N. *J Clin Microbiology*, 1990, 2668~2673.
- [9] McAdam R A, Hermans P W, Soolingen D Van et al. *Molecular Microbiology*, 1990, **4**: 1607~1613.
- [10] Ishiguro N, Sato G. *J Bacteriol*, 1990, **170**: 1902~1906.
- [11] Dinan W, Paul K, Calvin V. *J Clin Microbiology*, Nov 1990, 2561~2564.
- [12] Peter W M, Dick V S, Petra E E et al. *Infection and Immunity*, Aug 1991, 2695~2705.
- [13] Kunze Z M, Wall S, Appelberg R et al. *Molecular Microbiology*, 1991, **5**(9): 2265~2272.
- [14] Hfernandez P M, Fomukong N G, Hellyer G et al. *Molecular Microbiology*, 1994, **12**(5): 717~724.
- [15] Guerrero C, Bernosenci C, burkid D et al. *J Clin Microbiology*, Feb 1995, 304~307.
- [16] Guihot C, Gicquel B, Davies J et al. *Molecular Microbiology*, 1992, **6**(1): 107~113.
- [17] Dick V S, Peter W M, Petra E W et al. *J Clin Microbiology*, July 1992, 1772~1777.
- [18] Bons B, Till R, Thomas F et al. *J Clin Microbiology*, Aug 1990, 1751~1759.
- [19] Vincent A S, Jeremy L G, Barbara A B et al. *J Clin Microbiology*, Jan 1995, 149~153.
- [20] Mark A J, John A W, Nell S. *Applied and Environment microbiology*, 1993, **59**: 945~952.
- [21] Lappayawichit P, Rientong S, Rientong D et al. *Tubercle and lung disease*, 1996, **77**: 257~263.