

两种 DNA 探针杂交检测结核分支杆菌方法的研究*

杨华卫¹ 杨树德¹ 庄玉辉² 李国利² 李邦印²

(¹ 北京医院卫生部临床检验中心 北京 100730)

(² 解放军 309 医院结核病研究室 北京 100091)

摘 要: 为改进结核杆菌 DNA 探针的特异性与实用性, 研制了以生物素标记的两种对结核分支杆菌特异的 DNA 探针: 一个 5' 端标记的 20bp 的寡核苷酸探针和一个采用 PCR 方法合成的 188bp 长链探针。两种探针分别与结核分支杆菌的全染色体 DNA, 以及基因组上 IS6110 序列的一段 317bp 的 PCR 扩增产物进行斑点杂交, 以碱性磷酸酶 (AP) 催化的染色反应检测, 测试了两个探针的敏感性和特异性。系统地比较研究了两种探针杂交检测条件: 探针的浓度选择, 杂交温度与洗膜温度的选择, 以及杂交与洗膜温度对检测的敏感性与特异性的影响。寡核苷酸探针和 188bp 探针杂交检测纯化结核分支杆菌基因组 DNA 的敏感性分别为 100ng 与 6ng, 杂交检测 PCR 产物的敏感性分别是 400pg 与 50pg。两探针的最佳杂交浓度均为 40~160ng/ml, 最佳杂交温度分别是 42℃ 与 68℃, 最佳洗膜温度分别是 60℃ 与 60~68℃ 之间。两种探针均仅与结核分支杆菌及 BCG 有杂交信号, 而与其它受试分支杆菌及非分支杆菌杂交结果都呈阴性。它们的特异性都很强, 但 188bp 探针的敏感性约是寡核苷酸探针的 7~16 倍, 而且 188bp 探针检测本底较低, 是检测结核分支杆菌的较佳选择。

关键词: 寡核苷酸探针, 188bp DNA 探针, 斑点杂交, 敏感性与特异性

中图分类号: 939.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2000) 02-0143-49

多年来, 国内外研究者纷纷采用 PCR 及核酸探针技术检测结核分支杆菌。核酸探针的标记已从同位素发展到非同位素标记^[1], 在探针的长短方面, 则分为全染色体探针, PCR 合成的长链探针及寡核苷酸探针。全染色体 DNA 探针灵敏度较高但特异性不强。国内多采用全染色体 DNA 探针, 或者地高辛标记的 PCR 合成 DNA 探针, 检测方式则用进口的地高辛系统发光检测试剂盒^[2,3,4]。我们则选择制作并用生物素标记了一段寡核苷酸探针与一段 188bp 的长链 DNA 探针, 以碱性磷酸酶催化的呈色反应检测, 比较了它们检测结核分支杆菌基因组 DNA 及其 PCR 产物的灵敏度与特异性。

1 材料和方法

1.1 分支杆菌及非分支杆菌的来源

24 种分支杆菌来自中国药品生物制品检定所, 11 种非分支杆菌来自中国科学院微生物研究所。

1.2 DNA 提取方法

分支杆菌及非分支杆菌的基因组 DNA 的提取采用本室研制的标本前处理试剂盒。

* 国家自然科学基金资助项目 (39670696)

作者简介: 杨华卫 (1970-), 男, 山东临沐人, 博士, 主要从事医学微生物研究

收稿日期: 1998-12-11, 修回日期: 1999-04-09

1.3 基因组 DNA 的 PCR 扩增及扩增产物的纯化与定量

以结核分支杆菌复合群的 IS6110 插入序列^[5](共 1361bp)上的 884~568 核苷酸位点间的 317bp 片段作为 PCR 扩增的靶 DNA 片段。引物 TB41 和 TB43, 扩增条件按文献^[6]进行。将约 200 μ L 的 PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 切割回收含 317bp 片段的凝胶条, 采用华美公司的 DNA 纯化试剂盒处理凝胶, 最后得到纯化的 317bp DNA 片段, 溶于 TE, 用紫外分光光度计定量, -30 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 DNA 探针的制作与标记

1.4.1 寡核苷酸探针的制备

寡核苷酸探针来自 IS6110 序列(位于 781~762)核苷酸位点间), 其序列为 5' - CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG - 3'。此探针处于 PCR 靶 DNA 片段(317bp)的中间, 5' 端标以生物素的这段探针由赛百盛公司合成。

1.4.2 188bp 的长链 DNA 探针的制备:

采用 PCR 合成的方法进行, 扩增过程中, 以长链生物素修饰的 dUTP(Bio-dUTP)代替 dTTP 掺入到扩增混合物中, 得到标记率 5% 左右的探针。188bp 片段位于 IS6110 序列的 317bp 靶 DNA 片段的中间。所用引物序列^[7]为 PT3: 5' GAACGGCTGATGAC-CAAAC3', PT6: 5' ACGTAGGCGAACCTGCCCA3', 以 1:3 的 Bio-dUTP:dTTP 混合物代替纯 dTTP, 以纯化的 317bp PCR 扩增产物为靶 DNA 片段进行 PCR 扩增, 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 65 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 40 s, 28 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。将 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 采用试剂盒纯化 188bp 探针片段, 定量, -30 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 斑点杂交

1.5.1 寡核苷酸探针的点杂交检测: 点膜、杂交、洗膜及显色检测分别参照《基因诊断技术》^[8]及文献^[6]并略作改进。

1.5.2 188bp 长链探针点杂交检测: 点膜及显色部分同寡核苷酸探针, 杂交及洗膜则参照文献^[7], 并作了部分改进。

2 结果

2.1 纯化 PCR 产物浓度

结核分支杆菌标准株基因组的 317bp 扩增产物纯化后的浓度为 100ng/ μ L。PCR 合成标记的 188bp 长链探针纯化后的浓度为 50ng/ μ L。

2.2 两种 DNA 探针的最佳浓度选择

将 317bp DNA 片段倍比稀释成 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05ng/ μ L, 各取 1 μ L 点到硝酸纤维膜上, 共 11 个点, 第 12 点为阴性参照(鲑鱼精 DNA)。

寡核苷酸探针与 188bp 探针同时采用梯度浓度: 10, 20, 40, 80, 160, 320ng/mL 与靶 DNA 杂交。杂交膜显色结果见图 1 与图 2。从图 1 看出, 探针最佳使用浓度范围为 40~160ng/mL, 此时能够检测到 0.2ng 的靶 DNA。

从图 2 看出, 探针最佳使用浓度范围是 40~160ng/mL, 此时敏感性最高, 可以检测到 50pg 以下的靶 DNA。

比较两种探针发现, 188bp 探针比寡核苷酸探针敏感性高 4~10 倍。但二者的最佳

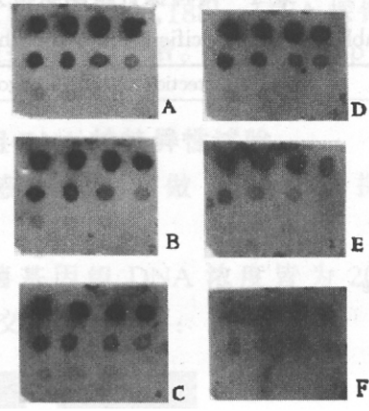
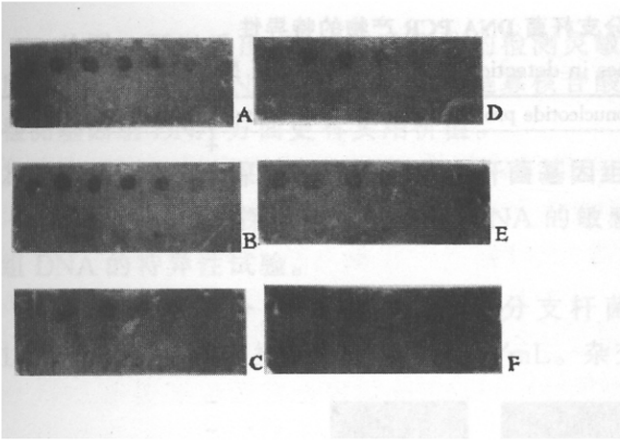


图 1 寡核苷酸探针检测结核分支杆菌 DNA PCR 产物的敏感性

Fig. 1 The sensitivity of oligonucleotide probe in hybridization with PCR products of MT DNA
Filter A, B, C, D, E and F were hybridized respectively with the probe of different concentrations which were 320, 160, 80, 40, 20, 10ng/mL. In every filter, the first dot contained 50ng of target DNA(317bp) and twofold dilutions were made thereafter.

图 2 188bp 探针检测结核分支杆菌 DNA PCR 产物的敏感性

Fig. 2 The detection sensitivity of 188bp DNA probe in hybridization with PCR products of MT DNA
Filter A, B, C, D, E and F were separately hybridized with the probe of different concentrations which were 320, 160, 80, 40, 20, 10ng/mL. In every filter, the first dot contained 50ng of target DNA(317bp) and twofold dilutions were made thereafter.

使用浓度范围却相同,这是由于它们的生物素标记率相同,都约为 5%。

2.3 两种 DNA 探针检测 PCR 产物的特异性试验

使用两种 DNA 探针对 24 种分支杆菌及 11 种非分支杆菌的 317bp PCR 扩增产物进行杂交、检测。探针浓度皆为 160ng/mL,结果见图 3,表 1。

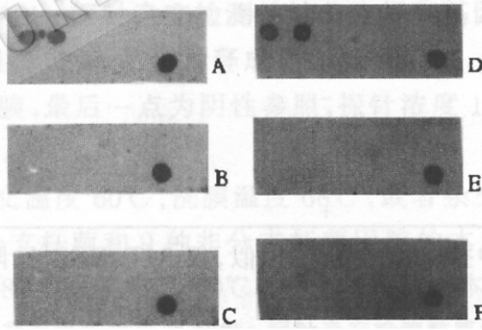


图 3 两种 DNA 探针检测 PCR 产物的特异性

Fig. 3 The specificity of two probes in hybridization with PCR products of MT DNA

Filter A, B and C are detection results of oligonucleotide probe, and filter D, E and F are detection results of 188bp DNA probe. For filter A and D, upper panel: the dots respectively contained BCG, MT, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracelulare*; lower panel: *M. avium*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. gastri*, *M. triviale*, positive control and negative control. For filter B and E, upper panel: *M. xenopie*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. parafortuitum*, *M. chelonae*, *M. chelonae* Subsp. *chelonae* and *M. diernhoferi*; lower panel: *M. nonchromogenicum*, *M. vaccae*, *M. gilvum*, *M. smegmatis*, *M. phlci*, positive control and negative control. For filter C and F, upper panel: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. pseudodiphtheriticum*, *S. viridans*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *M. Catarrhalis*; lower panel: *E. coli*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Corynebacterium pumilus*, *S. pneumoniae*, negative control, positive control and negative control.

表 1 两种探针检测结核分支杆菌 DNA PCR 产物的特异性

Table 1 The specificity of two probes in detection of PCR products of MT DNA

Bacteria species	Detection results of oligonucleotide probe	Detection results of 188bp DNA probe
BCG	+	+
<i>M. tuberculosis</i>	+	+
<i>M. bovis</i>	-	-
<i>M. kansasii</i>	-	-
<i>M. marinum</i>	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	-	-
<i>M. intracellulare</i>	-	-
<i>M. avium</i>	-	-
<i>M. simiae</i>	-	-
<i>M. szulgai</i>	-	-
<i>M. gastri</i>	-	-
<i>M. triviale</i>	-	-
<i>M. xenopie</i>	-	-
<i>M. gordonae</i>	-	-
<i>M. fortuitum</i>	-	-
<i>M. parafortuitum</i>	-	-
<i>M. chelonae</i>	-	-
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	-	-
<i>M. diernhoferi</i>	-	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	-	-
<i>M. vaccae</i>	-	-
<i>M. gilvum</i>	-	-
<i>M. smegmatis</i>	-	-
<i>M. phlci</i>	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	-	-
<i>S. viridans</i>	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>M. catarrhalis</i>	-	-
<i>E. coli</i>	-	-
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	-	-
<i>Corynebacterium pumilus</i>	-	-
<i>S. pneumoniae</i>	-	-
Negative control	-	-
Positive control	+	+

从表 2 可以看出,两种探针的特异性相似,仅 MT,BCG 呈阳性反应,不过 188bp 探针杂交检测的本底更低。

2.4 两种 DNA 探针直接杂交检测结核杆菌基因组 DNA 的敏感性

将基因组 DNA 倍比稀释成 440,220,110,55,28,14,7,3.5ng/ μ L 的 8 个浓度梯度,各取 1 μ L 点膜,第 9 个点为阴性对照(鲑鱼精 DNA)。结果见图 4:

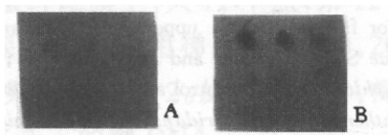


图 4 两种 DNA 探针直接杂交检测结核分支杆菌基因组 DNA 的敏感性

Fig. 4 The sensitivity of two probes in direct hybridization with MT genome DNA

Filter A and B were hybridized with oligonucleotide probe and 188bp PCR probe respectively, whose concentrations were all 160ng/mL. The first dot contained 440ng of genome DNA and twofold dilutions were made thereafter.

从图 4 可以看出,寡核苷酸探针的检测灵敏度为 110ng,188bp DNA 探针的检测灵敏度为 7ng,188bp DNA 探针的敏感性是寡核苷酸探针的 16 倍。因此,188bp DNA 探针在检测基因组 DNA 方面更有实用价值。

2.5 188bp DNA 探针杂交检测分支杆菌基因组 DNA 的特异性试验

由于寡核苷酸探针检测基因组 DNA 的敏感性太低,只做 188bpDNA 探针检测基因组 DNA 的特异性试验。

被试的 21 种分支杆菌与 9 种非分支杆菌基因组 DNA 浓度皆为 20ng/ μ L,各取 1.5 μ L 点膜,杂交。探针浓度是 160ng/mL。杂交结果见图 5:

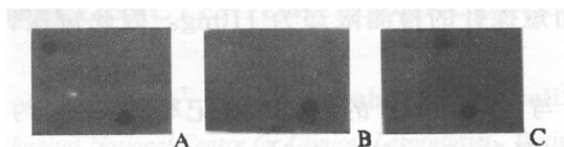


图 5 188bp DNA 探针杂交检测分支杆菌基因组 DNA 的特异性

Fig. 5 The specificity of 188bp DNA probe in hybridization with MT genome DNA

Filter A: the dots contained respectively genome DNA of MT, *M. bovis*, *M. simiae*, BCG, *M. Kansasii*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. stulgai*, *M. fortuitum*, *M. parafortuitum*, positive control and negative control; filter B: *M. Marianum*, *M. chelonae*, *M. chelonae* subsp. *chelonae*, *M. vaccae*, *M. nonchromogenicum*, *M. xenopi*, *M. triviale*, *M. phlci*, *M. gilrum*, *M. intracellulare*, positive control and negative control; Filter C: *M. avium*, *S. pneumoniae*, *S. viridans*, *S. aureus*, *C. pseudodiphtheriticum*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *N. catarrhalis*, positive control and negative control.

从图 5 可以看出,只有结核分枝杆菌呈阳性反应,而 BCG 点呈阴性反应,因此,在被测的 30ng DNA 水平上,188bp 探针只对结核分支杆菌特异杂交反应。

2.6 杂交,洗膜温度对 188bp 探针杂交检测结核分支杆菌基因组 DNA 的敏感性的影响

将结核分支杆菌基因组 DNA 倍比稀释成 100,50,25,12.5,6.2,3.1,1.5,0.7ng/ μ L8 个浓度梯度,各取 1 μ L 点膜,最后一点为阴性参照,探针浓度 160ng/mL。杂交温度,洗膜温度以及杂交结果见表 2。

表 2 结果表明,在杂交温度 60 $^{\circ}$ C,洗膜温度 68 $^{\circ}$ C,或者杂交温度、洗膜温度均在 60 $^{\circ}$ C 的条件下,受试的 21 种分支杆菌和 9 种非分支杆菌因膜的本底高,难于判定杂交反应的结果;相反,在杂交温度 68 $^{\circ}$ C,洗膜温度 60 $^{\circ}$ C 的条件下,膜的本底很低,清晰。

表 2 杂交洗膜温度对 188bp 探针杂交检测敏感性的影响

Table 2 The effect of hybridization temperature and washing filter on the sensitivity of 188bp DNA probe

Temperature of hybridization/ $^{\circ}$ C	Temperature of washing filter/ $^{\circ}$ C	Detection limit	Background
68	60	6.2ng	low
60	68	6.2ng	high
60	60	12.5ng	very high

2.7 温度对 188bp 探针杂交检测分支杆菌基因组 DNA 特异性的影响

本试验点膜浓度及探针浓度同图 5。选用杂交温度 68 $^{\circ}$ C、洗膜温度 60 $^{\circ}$ C 的条件,受试的 21 种分支杆菌和 9 种非分支杆菌中,只有结核分支杆菌呈阳性杂交反应,而其它受试的分支杆菌与非分支杆菌均呈阴性反应。而选用杂交温度 60 $^{\circ}$ C,洗膜温度分别为 60 $^{\circ}$ C

与 68℃ 时,杂交本底很高,无法判读结果。

3 讨论

通过对两种 DNA 探针的敏感性与特异性的比较研究,发现我们应用的寡核苷酸探针与 188bp 的长链探针无论是在杂交检测结核分支杆菌的基因组 DNA 方面还是在杂交检测其 PCR 扩增产物方面的特异性都很高,二者都专一性地与结核分支杆菌复合体杂交。但两探针检测的敏感性却相差较大。由于长探针的标记位点比寡核苷酸探针位点多,前者更灵敏,尤其是在直接杂交检测结核分支杆菌基因组 DNA 时差别特别明显:长探针的检测限是 7ng,而短探针的检测限却为 110ng。因此短探针在检测基因组 DNA 方面意义不大。

由于寡核苷酸探针与 188bp 探针的生物素标记率相同,都约为 5%,所以两探针的最佳使用浓度也是一致的,都为 40~160ng/mL。

而通过对两探针杂交检测结核分支杆菌的条件的研究,发现长探针检测的本底远低于寡核苷酸探针,这是因为较高的杂交温度可以使非特异性的杂交大大减少。在研究温度对 188bp 探针杂交检测结核杆菌敏感性的影响试验中,当杂交温度是 68℃ 时,对杂交后洗膜温度要求却不高,60~68℃ 范围皆可,当杂交温度低于 68℃ 时,尤其低至 60℃ 时,本底明显升高,当洗膜温度由 60℃ 升至 68℃ 时,在一定程度上使本底降低。因此,在 188bp 探针灵敏度试验中,应该采取较高的杂交温度(68℃)。在研究杂交洗膜温度对 188bp 探针特异性影响的试验中,此情形更加明显。当杂交温度为 68℃ 时,本底极浅,探针显示出极好的特异性;当杂交温度降为 60℃ 时,即使洗膜温度高至 68℃,本底仍大得把所有的点掩盖了。所以说,杂交温度至关重要,足够高的合适温度才能保证低的本底及特异性的杂交。

在研究 188bp 探针检测基因组 DNA 及 317bp 的 PCR 产物的特异性试验中,发现探针检测二者的特异性并不完全吻合。在前者中只有结核分支杆菌呈阳性杂交反应,而在后者,结核分支杆菌与 BCG 都呈阳性杂交反应。为什么呢?由于 188bp 探针杂交的靶序列 IS6110 在 BCG 中是单拷贝的,而在结核分支杆菌中却是十多个拷贝的^[5],所以检测 BCG 的敏感性还不到检测 H37Ra 的十分之一,也就是说探针检测 BCG 的基因组 DNA 量不能低于 $6.0\text{ng} \times 10 = 60\text{ng}$ 。而 BCG 的点膜量才 $1.5\mu\text{L}$,即 30ng,因此探针难于检测到 BCG DNA。在另一个实验中,当把 BCG 的点膜量加至 100ng 时,便呈阳性杂交反应,由此证明了以上的推论。

总之,188bp DNA 探针敏感性比寡核苷酸探针高很多,而且特异性很高,制作标记也容易,以生物素为中介的显色检测操作方便,记录容易,将它用于检测结核分支杆菌其基因组 DNA 及其 PCR 产物是一种有用的手段。

寻找更加灵敏的非同位素标记物、降低杂交本底以及方法的实用化是目前核酸探针的发展方向。

参 考 文 献

[1] 吴雪琼,庄玉辉,张晓刚,等. 中国防痨杂志,1992,14(2):79~80.

- [2] 李 勃,潘毓宣,张春燕,等. 中华结核与呼吸杂志,1994,17(4):238~240.
- [3] 朱诗应,杨毓华,李芳秋,等. 中华结核与呼吸杂志,1996,19(5):313.
- [4] 潘毓宣,李 勃,张春燕,等. 中华防痨杂志,1992,14(4):165~166.
- [5] Thierry D, Cace M D, Eisenach K D, et al. *Nucl Acids Res*, 1990,18(1):188.
- [6] Nolte F S, Metchock B, McGowan J E. *J Clin Microbiol*, 1993,31(7):1777~1782.
- [7] Kolk A H J, Schuitem A R J. *J Clin Microbiol*, 1992,30(10):2567~2575.
- [8] 王申五. 基因诊断技术. 北京;北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993,77~78.

STUDIES ON DETECTION METHODS OF TWO DNA PROBES IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS *

Yang Huawei¹ Yang Shude¹ Zhuang Yuhui² Li Guoli² Li Bangyin²

(¹ Beijing Hospital National Centre for Clinical Laboratories, Beijing 100730)

(² Tuberculosis Research Laboratory, The 309th Hospital, Beijing 100091)

Abstract: Two different biotinylated DNA probes which are highly specific to *M. tuberculosis* (MT) were made and studied. One probe is a 20bp oligonucleotide labeled with biotin at 5' end, the other is a long DNA probe produced by PCR amplification procedure allowed for the incorporation of biotin labeled UTP. The two probes were hybridized with MT genome DNA and a 317bp PCR product amplified from IS6110 sequence of MT, and then detected by alkaline phosphatase conjugates through colorimetric reaction. The detection sensitivity and specificity of the two probes were comparatively studied. The hybridization condition including concentration of probe, temperature of hybridization and washing filter thereafter were also investigated preliminary. The detection limit of the oligonucleotide probe and the 188bp PCR probe were 100ng and 6ng of DNA respectively in detection of *M. T* genome, and 400pg and 50pg of DNA respectively in detection of PCR products of MT. The two probes can be only hybridized to MT and BCG, but not with other 24 mycobacterium or non-mycobacterium tested. The optimal hybridization temperature and washing filter temperature of oligonucleotide were 42°C and 60°C respectively; and that of 188bp probe, 68°C and 60°C~68°C. Generally the specificity of two probes were all high, but the sensitivity of 188bp DNA probe was 7~16 times that of the oligonucleotide probe. The higher sensitivity, lower hybridization background and faster revelation of the 188bp DNA probe made it a better choice in detection of MT.

Key words: Oligonucleotide probe, 188bp DNA probe, Dot-blotting hybridization, Sensitivity and specificity

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39670696)