

聚合酶链式反应检测结核杆菌的研究

庄玉辉 吴雪琼 张小刚 李国利

(中国人民解放军第三〇九医院结核病研究室, 北京 100091)

以人型结核杆菌基因组 DNA 为模板, 合成二段引物各 20 个碱基进行聚合酶链式反应 (PCR)。经琼脂糖凝胶电泳证实, 获得一条 245bp 扩增带。PCR 检测的敏感性染色体基因组 DNA 为 1pg, 菌悬液为 13 个活菌/ml。在特异性试验中, 人型结核杆菌、牛型结核杆菌、BCG 可见此扩增带。被试的其它 14 种抗酸菌以及变铅青链霉菌、大肠杆菌质粒 PUC19、星状诺卡氏菌、红球菌均未见该扩增带。54 例肺结核痰标本 3 种方法检查的阳性率分别为: 萋尼氏抗酸染色 16.7%, 培养法 14.8%, PCR 37.0%。前 2 种检查方法分别与 PCR 比较, 经统计学处理均有显著性差异 ($P < 0.01$)。12 例非结核性肺部疾患痰标本抗酸染色和 PCR 均为阴性。结果表明, PCR 技术是快速、敏感、特异诊断结核病的方法。

关键词 肺结核病; 结核杆菌; PCR

1985 年, 美国 Mullis 等人首创的 PCR 技术(即 DNA 体外扩增技术)是 DNA 重组技术的又一个突破。它在遗传病诊断、微生物和某些癌变的检测以及分子生物学研究等许多领域得到了迅速而又广泛的应用。在结核病诊断方面也刚起步。1989 年法国的 Hance 等^[1]报道用 PCR 技术可检测临床标本中分枝杆菌(人型结核杆菌等 5 种)少于 100 个菌。其后, 美国、荷兰、英国等一些研究者又相继有类似的报告^[2-4]。长期以来, 在结核病病原学诊断的传统方法中, 抗酸染色特异性差, 培养很慢, 需 8 周方可最终判定阴性结果。PCR 技术在基因水平上为结核病的快速、敏感、特异诊断提供了更新的手段。本文介绍 PCR 技术检测结核杆菌的有关试验条件及用于检测肺结核病人痰标本的结果。

材料与方 法

(一) 材料

1. 细菌菌种: 本研究所用菌种均由中国药品生物制品检定所和中国科学院微生物研究所提供。

2. 痰标本的收集: 54 例肺结核病人和 12 例非结核性肺部疾患病人(肺癌 6 例, 肺炎与肺霉菌病 6 例)系本院结核科和呼吸科住院病人。根据临床表现、体征, 经胸部 X 线检查以及细菌学或病理学检查确诊。留晨痰。

3. 引物合成: 按 Hermans^[2] 报道的寡核苷酸序列:

INS-1(5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC)

INS-2(5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA), 由中国科学院微生物研究所合成。

4. PCR 试剂盒:购自军事医学科学院。

5. 培养基:改良罗氏鸡蛋培养基,按常规方法配制。

(二) 方法

1. 痰标本分枝杆菌基因组 DNA 提取:基本按照 Hermans^[2] 介绍的方法,略加改进。

2. 分枝杆菌参考菌株基因组 DNA 提取:按《分子克隆手册》介绍的方法进行。

3. PCR 操作:热变性、退火及引物延伸:在 50 μ l 反应体系内,一对引物各加 0.5 μ l (100—150ng),模板基因组 DNA 1 μ l 含 100ng,其它参照 Hermans^[2] 介绍的方法。其后加入 0.5 μ l (2.25u) Taq DNA 聚合酶,在水浴恒温箱内手工操作,依 94 $^{\circ}$ C 1 分钟,65 $^{\circ}$ C 3 分钟,最后 7 分钟。共 35 个循环,必要时再次扩增。

4. 扩增产物鉴定:经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳,电压 50—60V。电泳后,胶板用 10mg/ml 溴化乙锭液染色,水冲洗,在紫外检测仪 254nm 波长下判定结果,必要时照相。

5. 抗酸染色:痰标本涂片,按萋尼氏法进行抗酸染色,在油浸镜下观察 300 个视野见 3 个杆菌以上者即判为阳性。

6. 培养:痰标本按全国结核病细菌学检验标准化规程进行前处理,每份标本各取 0.1 ml,分别接种 2 支斜面,置 37 $^{\circ}$ C 培养,每周观察结果一次,至第 8 周。

7. DNA Southern 印迹杂交:将 PCR 扩增后的混合液, Southern 转移到硝酸纤维素膜上,用本室自制的光敏生物素标记人型结核杆菌 DNA 探针进行杂交反应,进一步检测扩增产物。

结 果

(一) PCR 检测结核杆菌基因组 DNA 敏感性试验

人型结核杆菌 H₃₇RV 基因组 DNA 每微升 100ng 起始,用 PCR 缓冲液依次 10 倍稀释至 10fg。另一试验中,将人型结核杆菌 H₃₇Ra 培养物配制成 1 mg/ml (湿重) 菌悬液,以非结核性胸水 10 倍递增稀释至 10⁻⁸ mg/ml,分别进行活菌计数,并抽提染色体基因组 DNA。其后,分别进行 PCR。经琼脂糖凝胶电泳证实,PCR 检测结核杆菌的灵敏度提纯的染色体基因组 DNA 为 1pg,菌悬液为 13 个活菌细胞/ml,比 DNA 探针敏感性高。当然,在做参考菌株基因组 DNA PCR 时,PCR 反应体系内,各反应物的浓度,特别是模板 DNA,镁离子以及 Taq DNA 聚合酶等及其相互间的比例,反应缓冲液的 pH 对灵敏度均有较大的影响。

(二) PCR 检测结核杆菌基因组 DNA 特异性试验

分枝杆菌参考菌株特异性试验:表 1 所列被试参考菌株各自培养至适宜时间(慢生长菌 3—4 周,快生长菌 3—5 天),刮取菌落,用生理盐水制成菌悬液,提取基因组 DNA,与上述引物进行扩增试验,观察其特异性。从表 1、图 1 看出,该引物与人型结核杆菌、牛型结核杆菌、BCG 基因组 DNA 有一条 245bp 扩增带。与其它被试的 14 种抗酸菌以及变铅青链霉菌、大肠杆菌质粒 PUC19、星状诺卡氏杆菌、红球菌等非抗酸菌未见 245bp 扩增带,也无其它扩增产物。

分枝杆菌临床分离株的验证:4 株人型结核杆菌、1 株牛型结核杆菌均有 245bp 扩

表 1 PCR 检测分枝杆菌特异性试验结果

Table 1 The specificity of *Mycobacterium* by PCR amplification

菌种名称 Name of bacteria species	抗酸染色镜检 Fast-acid staining	扩增产物(245bp)* Amplified product
人型结核杆菌 <i>M. tuberculosis</i>	+	+
牛型结核杆菌 <i>M. bovis</i>	+	+
卡介苗 <i>M. bovis BCG</i>	+	+
堪萨斯分枝杆菌 <i>M. Kansasii</i>	+	-
瘰癧分枝杆菌 <i>M. scrofulaceum</i>	+	-
猿分枝杆菌 <i>M. smiae</i>	+	-
鸟分枝杆菌 <i>M. avium</i>	+	-
胞内分枝杆菌 <i>M. intracellulare</i>	+	-
戈登氏分枝杆菌 <i>M. gordonae</i>	+	-
牡牛分枝杆菌 <i>M. vaccae</i>	+	-
次要分枝杆菌 <i>M. triviale</i>	+	-
土分枝杆菌 <i>M. terrae</i>	+	-
不产色分枝杆菌 <i>M. nonchromogenicum</i>	+	-
偶发分枝杆菌 <i>M. fortuitum</i>	+	-
耻垢分枝杆菌 <i>M. smegmatis</i>	+	-
草分枝杆菌 <i>M. phlei</i>	+	-
淡黄分枝杆菌 <i>M. gilvum</i>	+	-
变铅青链霉菌 <i>Streptomyces lividian</i>	-	-
大肠杆菌质粒 PUC19 <i>E. coli</i> plasmid PUC19	-	-
星状诺卡氏杆菌 <i>Nocardia asteroides</i>	+	-
红球菌 <i>Rhodococcus</i>	-	-

* +: 琼脂糖凝胶电泳可见扩增带; -: 未见扩增带。

+: to see amplified band by agarose gel electrophoresis; -: no see.

表 2 PCR 检测肺结核标本中结核杆菌的阳性率

Table 2 The positive rate of *M. tuberculosis* in sputum specimens of pulmonary tuberculosis by PCR

组别 Groups	例数 No. of cases	分枝杆菌检测结果 The results detection in <i>Mycobacterium</i>		
		阳性数(%) No. of positive		
		萋尼氏染色法 Fast-acid staining	培养法 Culture	PCR
肺结核 Pulmonary tuberculosis	54	9(16.7)	8(14.8)	20(37.0)
非结核性肺部疾患 Non-tuberculosis lung disease	12	0(0)	0(0)	0(0)

扩增带, 仅 1 株堪萨斯分枝杆菌未见该扩增带。

(三) PCR 技术检测肺结核病人痰标本中结核杆菌的效果

选择 54 例肺结核病人痰标本, 12 例非结核性肺部疾患痰标本作为疾病对照组, 比较

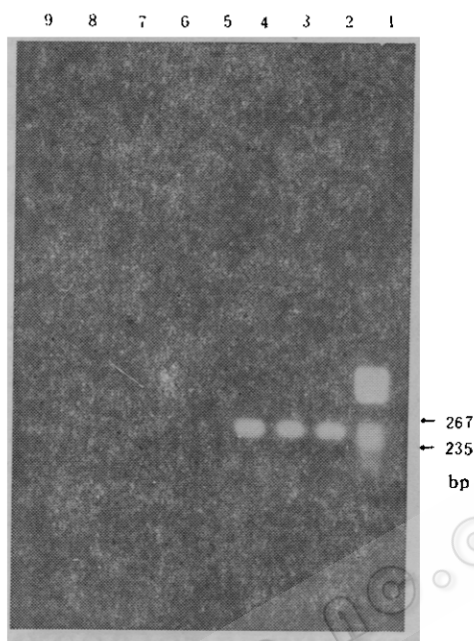


图1 PCR 扩增分枝杆菌基因组 DNA 的特异性(琼脂糖凝胶电泳)

Fig. 1 Specificity of genomic DNA of *Mycobacterium* by PCR amplification (agarose gel electrophoresis)

1. 分子量标准 PBR 322-Hae III; 2. 人型结核杆菌 H₃₇RV 基因组 DNA; 3. 牛型结核杆菌基因组 DNA; 4. BCG 基因组 DNA; 5. 堪萨斯分枝杆菌基因组 DNA; 6. 瘰癧分枝杆菌基因组 DNA; 7. 鸟分枝杆菌基因组 DNA; 8. 胞内分枝杆菌基因组 DNA; 9. 偶发分枝杆菌基因组 DNA。

1. DNA size standards; 2. *M. tuberculosis* H37RV genomic DNA; 3. *M. bovis* genomic DNA; 4. *M. bovis* BCG genomic DNA; 5. *M. Kansaii* genomic DNA; 6. *M. scrofulaceum* genomic DNA; 7. *M. avium* genomic DNA; 8. *M. intracellulare* genomic DNA; 9. *M. fortuitum* genomic DNA.

3 种检查方法检测分枝杆菌或结核杆菌的敏感性(表 2、图 2)。54 例肺结核病人痰标本用 3 种方法检查的阳性率分别为: 萆尼氏抗酸染色法 16.7%, 培养法 14.8%, PCR 为 37.0%。前两种方法分别与 PCR 比较, 经统计学处理均有显著性差异($P < 0.01$)。12 例非结核性肺部疾患的痰标本, 3 种检查方法其结果均为阴性。

随意取肺结核痰标本 PCR 扩增阳性和阴性混合液各 5 份, 经 Southern 转移后, 与光敏生物素标记的人型结核杆菌全染色体 DNA 探针进行杂交。结果表明, 扩增阳性标本探针杂交仍呈阳性反应, 反之, 呈阴性。这在 DNA 探针水平上初步排除假阳性和假阴性诊断。

讨 论

上述实验结果表明, PCR 可检测 1pg 人型结核杆菌基因组 DNA。有的文献报道 PCR 检测人型结核杆菌 DNA 的灵敏度为 10—100fg, 相当于 10—20 个细菌^[5-8]。灵敏度最高为 1fg, 约 1 个细菌的 DNA 量都能被检测出来^[3,5]。PCR 与结核病原学其它

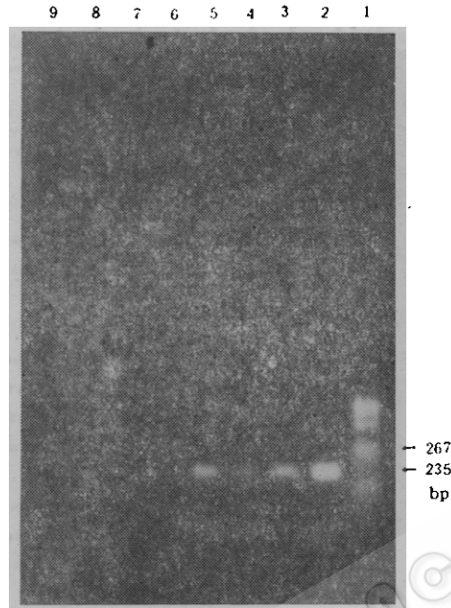


图2 PCR 扩增结核性与非结核性痰标本中结核杆菌 245bp 序列的特异性(琼脂糖凝胶电泳)

Fig. 2 The specificity of 245 bp sequence in sputum specimens for tuberculosis and nontuberculosis (agarose gel electrophoresis)

1. 分子量标准 PBR 322-Hae III; 2. 人型结核杆菌 H₃₇RV 基因组 DNA; 3. 肺结核痰标本 7 号; 4. 肺结核痰标本 10 号; 5. 肺结核痰标本 14 号; 6. 肺结核痰标本 8 号; 7. 肺结核痰标本 9 号; 8. 肺癌痰标本 7 号; 9. 肺癌痰标本 8 号。

1. DNA size standards; 2. *M. tuberculosis* H37RV genomic DNA; 3. Sputum specimen of pulmonary tuberculosis 7; 4. Sputum specimen of pulmonary tuberculosis 10; 5. Sputum specimen of pulmonary tuberculosis 14; 6. Sputum specimen of pulmonary tuberculosis 8; 7. Sputum specimen of pulmonary tuberculosis 9; 8. Sputum specimen of lung cancer 7; 9. Sputum specimen of lung cancer 8.

诊断方法相比要敏感的多,如抗酸染色和 DNA 杂交方法均需含 10^4 — 10^6 个细菌。分枝杆菌的分离培养一般样品中含 10—100 个活菌即可培养出来,但耗时很长,这对于缓慢生长的分枝杆菌是很困难的。而用 PCR 方法则不受此影响。PCR 检测结核病临床标本中结核杆菌的敏感性文献报道的资料不尽相同。本研究结果表明,PCR 检测肺结核病人痰标本的敏感性比抗酸染色法和培养法都高,与 Chia 等^[9]报道的结果相似,而 Shankar 等^[10]报道 3 种检测方法的敏感性没有差别。其原因除了上述的 PCR 技术本身的影响因素外,临床标本的处理是一个重要环节,这一点已被本研究结果所证实。

PCR 检测分枝杆菌的特异性也和其它细菌一样,取决于所选择的扩增靶序列是否为该分枝杆菌种的特异性片段。能否忠实地扩增该特异片段,则由人工合成的寡核苷酸引物的序列所决定。因此,设计引物序列是决定 PCR 特异性的关键问题。

目前因所有分枝杆菌的基因组图谱尚不清楚,所以应用 PCR 方法检测、鉴定分枝杆菌尚不多。大多用于检测人型结核杆菌的引物,只能将结核杆菌复合体与其它非典型分枝杆菌区别开来,难以鉴定菌型。只有 Patel 等^[11]报道的引物,可将牛型结核杆菌与结核

杆菌复合体的其它菌种区别开。Wit 等^[6]报道的引物可区别人型结核杆菌和卡介苗。今后还需要研究分枝杆菌种的特异性片段,为 PCR 用于菌种鉴定打下基础。

分枝杆菌系 G+C 含量高的细菌,一般在 70% 以上,引物中的 G+C 含量也必然高。它们被 A 和 T 碱基很好地隔开。因此,在进行 PCR 时增加退火温度至 65°—70℃ 可提高分枝杆菌 PCR 的特异性。本研究将退火温度提高至 65℃,并与延伸合为一步,是否对敏感性有影响,有待今后继续研究。

参 考 文 献

- [1] Hance, A. J. et al.: *Molec. Microbiol.*, 3: 843, 1989.
- [2] Hermans, P. W. M. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 28:1204, 1990.
- [3] Patel, R. J. et al.: *ibid.* 28:513, 1990.
- [4] Shankar, P. et al.: *Lancet*, 335:423, 1990.
- [5] Eisenach, K. D. et al.: *JID*, 161:977, 1990.
- [6] Wit, D. D. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 28:2437, 1990.
- [7] Thierry D. et al.: *ibid.* 28:2668, 1990.
- [8] Chia, C. P. et al.: *ibid.*, 28:1877, 1990.

DETECTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN SPUTUM SPECIMENS OF PULMONARY TUBERCULOSIS BY DNA AMPLIFICATION

Zhuang Yuhui Wu Xueqiong Zhang Xiaogang Li Guoli

(309 Hospital of PLA Tuberculosis Research Laboratory, Beijing 100091)

The PCR was used to detect *M. tuberculosis* DNA sequences in uncultured clinical specimens. Two oligonucleotide primers with 20 bp each amplified target template DNA of *M. tuberculosis*. Amplified DNA product was 245 bp which was identified by agarose gel electrophoresis. The sensitivity of detection of *M. tuberculosis* genomic DNA and bacteria suspension by PCR was 1pg and 13 viable bacteria cell/ml, respectively. In specificity experiments, only *M. tuberculosis*, *M. bovis* and BCG were positive by PCR, but all other 14 *Mycobacterium* tested, including *streptomyces lividans* and *E. coli* plasmid PUC19 were negative.

The sensitivity of detection of *M. tuberculosis* by PCR was determined by comparing the fast-acid staining and culture on total 54 sputum specimens of pulmonary tuberculosis and 12 nontuberculosis lung disease. The positive rate of PCR in pulmonary tuberculosis were 37.0%, culture method showed only 14.8%, fast-acid staining were 16.7%. Nontuberculosis lung disease were negative.

The results show that DNA amplification is a superior method with high degree of sensitivity and specificity for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis.

Key words Pulmonary tuberculosis; *M. tuberculosis*; PCR