

分子信标用于结核分枝杆菌的均相荧光 PCR 检测

李庆阁 梁基选 栾国彦 张洋

1996 年 Tyagi 等^[1]提出的分子信标是一种具有颈环构型的分子探针,用于 PCR 扩增产物均相测定的原理是,在退火阶段,分子信标与生成的靶序列结合发出荧光,在延伸阶段,则脱离靶序列而不干扰扩增,随着循环次数的增加,与模板结合的分子信标的量亦增加,最终的荧光强度便与模板量成正相关。我们在原来“分子信标”原理基础上,对其设计思想进行了重要改进,合成出效率更高的分子信标,并自行研制了简便适用的荧光测定装置。本文报告用于结核分枝杆菌的检测结果。

材料和方法

菌株:分枝杆菌属包括堪萨斯分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、鸟分枝杆菌、海分枝杆菌、偶发分枝杆菌、胞内分枝杆菌、母牛分枝杆菌、胃分枝杆菌、草分枝杆菌;其它菌株包括肺炎球菌、布氏菌、大肠杆菌、百日咳菌。结核分枝杆菌菌液含量分别为 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 菌/ml。所有菌株均由中国药品生物制品检定所提供。

引物与分子信标探针:选择结核杆菌插入序列 IS 986 设计一对引物^[2],引物 1 为 5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GG-3',引物 2 为 5'-GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3'。该对引物对人型结核杆菌、牛型结核杆菌、卡介苗菌、非洲分枝杆菌及田鼠分枝杆菌有特异扩增产物,扩增片段长度为 245bp。

在设计分子信标时,我们认为将互补序列延伸至发夹臂部分不会影响发夹的作用,不仅提高了分子信标的利用率,还能增加与模板结合后的分子信标中荧光染料和猝灭剂之间的距离,更有利于荧光的恢复。实验中取两引物之间一段序列,经 OLI-GO4.0 软件分析设计为,5' FAM-**GGC TGA** TGA CCA AAC TCG GCC TGT C CA **GCG**-DABCYL-3' (划线部分为发夹臂互补序列,斜体为与模板无关序列)。引物

由上海生工生物工程公司合成。分子信标自行合成、标记,最后经聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。

PCR 测定:取痰液标本 1ml 经 2ml 1mol/L NaOH 液化,取中层 500 μ l, 15 000r/min 离心 10 min, 弃上清,沉淀中加三蒸水 500 μ l, 混匀, 14 000r/min 离心 10 min, 弃上清,留取沉淀,加 50 μ l 样品提取液(2% Triton X-100, 1% NP-40), 混匀,置沸水浴 100 $^{\circ}$ C 15 min, 14 000r/min 离心 5 min。取上清备用。其它标本直接取 500 μ l, 14 000r/min 离心 10 min。后按痰液标本同样处理后,取上清备用。25 μ l PCR 反应体系内含 10mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 50mmol/L KCl, 1.0U Taq 酶(Promega), 200 μ mol/L dNTP(Pharmacia), 1.5mmol/L MgCl₂, 0.4 μ mol/L 引物和 0.4 μ mol/L 分子信标及 5 μ l 样本溶液。在热循环仪(MJ/PTG-100 型,基因公司)上 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后,按 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 1 min 运行 40 个循环,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s 后,于 65 $^{\circ}$ C 退火 1 min 结束。然后将 PCR 反应管置于荧光计(TD-360, Turner Designs)的微量样品架(自行研制)上测定荧光强度。以 3SD 法判断阴阳性。

特异性和灵敏度测定:分别对其它分枝杆菌、非分枝杆菌、结核分枝杆菌及 10 倍连续稀释的卡介苗进行 PCR 扩增,然后依次进行琼脂糖凝胶电泳检测和均相荧光 PCR 检测。

临床样本检测:取结核病患者痰液标本 316 例和正常标本 150 例(福州市肺科医院,厦门市结核病院)分别用涂片法和均相荧光 PCR 进行检测。另取其中 54 例进行培养观察。

结果与讨论

1. 分子信标用于结核分枝杆菌的均相荧光 PCR 测定:不同循环数测定 TB 标准浓度(菌数/ml) 0、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 的结果,如图 1 所示,循环数较少时(21~28),各个浓度都未有荧光强度的明显变化,随着循环数的增加,高浓度 TB 样品的荧光首先增加,38~40 个循环后,本底荧光依然增加微小,而各个样品的荧光强度与对应的浓度已呈明显的正相关。本实验的每个数据都是由不同的反应管获得的,所获得的荧光强度的变化趋势及其与浓度的正

作者单位:361005 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室,厦门大学生物学系(李庆阁),厦门大学抗癌中心(梁基选);厦门泰伦生物工程有限公司(栾国彦,张洋)

通信作者:李庆阁,361005 厦门大学生物学系(E-mail: qgli@xmu.edu.cn)

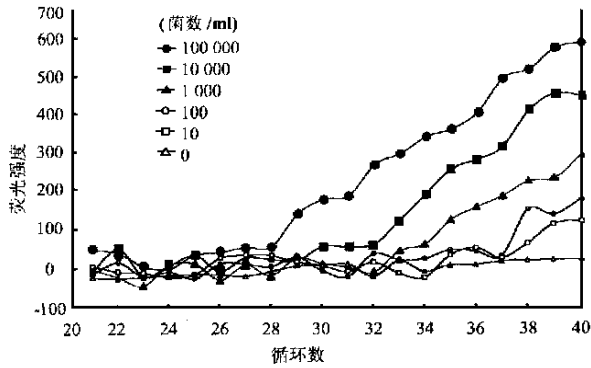


图1 分子信标用于不同稀释度结核分枝杆菌的均相荧光 PCR 检测

相关关系和预期结果一致,证实了方法的可行性。

2. 特异性和灵敏度:用均相荧光 PCR 检测其它分枝杆菌和非分枝杆菌均显示阴性。结核杆菌则呈阳性。采用结核分枝杆菌菌液(含量分别为 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 菌/ml)可检出 1~10 菌/ml。用“冻干皮内注射用卡介苗”进行 10 倍连续稀释,琼脂糖凝胶电泳可检测至 10^5 样品浓度,均相荧光 PCR 可检测至 10^6 样品浓度,显示出更高的灵敏度。

3. 标本的检测:取疑有结核分枝杆菌的痰液标本共计 316 例,分别用涂片法、培养法和均相荧光 PCR 法进行检测,结果见图 2。

以上结果表明,对于涂片法和培养法检出为阳

		涂片法		培养法	
		+	-	+	-
荧光法	+	95	113	19	15
	-	8	150	1	19

图2 涂片法、培养法、荧光 PCR 法检测结果

性的样本,荧光 PCR 法的灵敏度分别为 92.2% 和 95%,特异度分别为 57.9% 和 55.9%。对于正常阴性标本,均相荧光 PCR 法与涂片法符合率为 100%。荧光 PCR 法的阳性检出率(65.8%)显著高于涂片法(32.6%)和培养法(37.0%),显示均相荧光 PCR 法具有更高的敏感性。均相荧光 PCR 测定法省却了 PCR 后处理过程,不仅大大提高了样品的分析速度,简化了操作步骤,而且可消除扩增产物引起的交叉污染。利用自行研制的微量 PCR 样品管架,可在普通荧光计上实现定性和半定量测定。本文结果为分子信标大规模用于 PCR 诊断提供了模式。

参 考 文 献

- 1 Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluorescence upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 1996, 14:303-308.
- 2 Kok AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a non-radioactive detection system. *J Clin Microbiol*, 1992, 30:2567-2575.

(收稿日期:1999-05-31)

荧光定量聚合酶链反应检测弓形虫 DNA 及其临床应用

符生苗 阮和球 陈鑫萍 庞海云 徐文 凌奕 杨力芳

我们设计合成了弓形虫(TOX)荧光定量 PCR(Fluorescence Quantitative PCR, FQ-PCR)诊断试剂盒,以一种完全闭管式的 PCR 和荧光探针杂交技术相结合所产生的实时检测定量 PCR 方法,检测了 225 例产妇产血清标本和 179 例新生儿脐血标本的 TOX-DNA 的含量,同时与免疫指标进行比较,探讨其在弓形虫临床诊断中的应用价值。

225 例产妇产血清 TOX-IgG 阳性 29 例,阳

性率为 12.89%, IgM 阳性 33 例(14.67%), FQ-PCR 阳性 28 例(12.44%), 平均拷贝数值(mI^{-1})为 1.68×10^5 , 常规 PCR(PCR 电泳-EB 染色)阳性 29 例(12.89%)。179 例新生儿 TOX-IgG 阳性 11 例(6.15%), IgM 阳性 3 例(1.68%), FQ-PCR 阳性 7 例(3.91%), 平均拷贝数值(mI^{-1})为 2.29×10^5 , PCR-EB 阳性 9 例(5.03%)。结果显示,在 36 例 TOX-IgG 阳性标本中, FQ-PCR 中阳性者仅有 26 例, TOX 阴性者的 FQ-PCR 阳性有 10 例,说明 ELISA 法检测抗体并非直接检测病原体(抗原),而 PCR 法直接检测病原体本身。FQ-PCR 的反应产物,用电泳和紫外线检测,能得到与常规 PCR 一样的结

果,即都可见 225bp 的特异性扩增条带。

弓形虫感染的诊断目前多采用 ELISA 检测弓形虫特异性抗体 IgM 和 IgG, ELISA 法方法简单快速,有较好的敏感性和特异性。但抗体检测并非直接检测病原体,难以确诊。PCR 方法是检测 TOX 自身,更准确灵敏地反应了 TOX 的感染和治疗恢复情况。值得提出的是,血清中 TOX 的数量与 TOX 的疗效可能有一定相关性,提示临床医生可根据血清中 TOX 的数量对弓形虫患者进行动态观察。随着分子诊断概念和技术的发展与推广, FQ-PCR 在治疗方案选择和疗效观察方面必将有广泛的应用前景。

(收稿日期:2000-02-01)

作者单位:570311 海口,海南省人民医院医学研究中心(符生苗,阮和球,陈鑫萍,庞海云,凌奕);中山医科大学达安基因诊断中心(徐文,杨力芳)

通信作者:符生苗(E-mail: hnafsm@163.net)