

综述

沙眼衣原体的 PCR 检测

郭本昌 苏文全

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, *C. t*)可引起眼部感染,还可引起尿道炎、宫颈炎、子宫内膜炎、输卵管炎、附睾炎、直肠炎等多种疾病。在欧美国家,*C. t*在泌尿生殖道感染中的严重性已超过淋球菌而成为性传播疾病的主要病原体^[1]。在国内,对*C. t*类疾病的许多情况尚不清楚,据部分地区调查的结果表明,在解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*),人型支原体(*Mycoplasma hominis*),沙眼衣原体三种人类泌尿生殖道感染的常见病原体中*C. t*抗体的阳性率是最高的^[2]。广州地区性病沙眼衣原体的血清型分析与国外报道的基本相似^[3]。感染衣原体的孕妇,产下的婴儿中有50~70%将成为带菌者^[4]。目前,*C. t*的实验室诊断方法主要有:细胞培养法、直接免疫荧光法(DFA)、微量免疫荧光法(MIF)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、DNA探针杂交法和PCR法等,其中以PCR法简便快速,具有高度的敏感性和特异性。

一、沙眼衣原体的主要生物学特性

*C. t*专性细胞内寄生,具有独特的生活周期,由有感染性的原生小体(Elementary body)和非感染性的网状体(Reticulate body)构成,在宿主细胞内能形成典型的胞浆包涵体。*C. t*的外膜复合物的主要成份是40,60,12kD的蛋白质和脂多糖(LPS)。主要外膜蛋白(MOMP)为40kD蛋白质,具有复杂的抗原系统,包括型、亚种、种,可能还有属特异性抗原决定簇。*C. t*可根据主要外膜蛋白抗原的不同分成18个血清型即A~K, Ba, L₁, L₂, L₃, D₁, I₁, L_{2a}血清型,其中D~K血清型在成人可引起泌尿生殖道感染。*C. t*的基因组为1.45kb的双链

DNA,属于基因组最小的原核生物之一,仅为大肠杆菌的1/3^[5]。其RNA的主要成份是21、16、4srRNA。所有的*C. t*都含有7.5kb的“隐蔽”质粒,并且发现这种质粒与其它生物间没有同源序列。*C. t*耐冷而不耐热,-50℃以下活性可保持1年以上,4℃下只能保存1周,50℃加热30min死亡。干燥易失活,对乙醚,氧化剂,硫柳汞,链霉素,新霉素等有抵抗力,但能为酒精、甲醛等迅速杀灭,对多种抗生素敏感。

二 *C. t*的PCR检测

PCR(Polymerase Chain Reaction)是八十年代中期才建立和发展起来的用于体外扩增特定DNA序列的技术。其原理是:将待扩增DNA先加热变性成单链,以此作为模板与位于待扩增序列两侧分别与模板DNA的相对链互补的两个寡核苷酸引物退火,在四种dNTP和Taq聚合酶的存在下使引物沿模板延伸。这样,变性、退火和引物延伸三步成为一个扩增循环。由于每一轮扩增的产物均可作为下一轮扩增的模板,因此每一轮循环所产生的DNA拷贝数均比前一轮多一倍,经过30个循环后,靶序列的拷贝数增加约10⁶~10⁷倍。由于这种方法十分简便,实用性强,灵敏度高并可自动化,因此得到广泛地使用。传染病的诊断是PCR技术应用的一个重要方面。

(一)*C. t*引物的设计:PCR技术的关键是引物的设计和人工合成,它决定了PCR扩增片段的长度、位点以及扩增的特异性。*C. t*的PCR检测首先要选择具有特异性的扩增DNA片段。目前已经测序并已用于PCR检测的*C. t*

作者单位:厦门大学生物系(厦门,361005)

DNA 主要有三种:16srRNA 基因^[6]、7.5kb 质粒^[7]、主要外膜蛋白(MOMP)基因^[3]。其中,16srDNA 高度保守,C.t 与鸚鵡热衣原体的16srDNA 的同源性约 95%,适于段的长度,位点以及扩增的特异性。C.t 的 PCR 检测首先要选择具有特异性的扩增 DNA 片段。目前已经测序并已用于 PCR 检测的 C.t DNA 主要有三种:16srRNA 基因^[6]、7.5kb 质粒^[7]、主要外膜蛋白(MOMP)基因^[8]。其中,16srDNA 高度保守,C.t 与鸚鵡热衣原体的 16srDNA 的同源性约 95%,适于构建 C.t 属特异性引物^[9]。7.5kb 质粒是 18 型 C.t 共同的内源引物之间也在引物与靶 DNA 之间起作用,从而影响引物的退火温度,而退火温度的高低又直接影响 PCR 的敏感性。L. Ostergaard 等^[10]设计了两

套引物(见附表),第一套引物中(C+G)%低,第二套引物(C+G)%高且超过了靶 DNA 中的(G+C)%。实验结果表明,第一套引物的最适退火温度为 45℃,而第二套引物的最适退火温度为 57℃,且第二套引物的敏感性比第一套引物有明显的提高。设计引物时,当考虑到引物的(C+G)%时,还要尽可能地使引物对中两个引物有相近的(C+G)%,并使它们超过靶 DNA 的(C+G)%。这样就可以避免在引物与靶 DNA 之间退火之前,靶 DNA 之间退火。高的退火温度能产生高的敏感性的原因是由于高温降低了单链 DNA 的二级结构的形成。实际上,随着循环次数的增加,PCR 敏感性却降低的原因就是由于扩增 DNA 片段之间的退火所引起的^[12]。

附表 C.t 引物的设计

引物	碱基顺序	扩增片段长度	最适退火温度(℃)
引物 A	5'-GTTTAAGTGTTCCCATCATAAAAACATATTC-3'	503bp	45
对 I B	5'-ATCCTTGTATCCTGTTGGAAGCCATCAAAG-3'		
引物 A	5'CGCATGCAAGATATCGAGTATGCGGTTGTTACG-3'	473bp	57
对 II B	5'-GCGTCGCGATCTCCGGCCAG-3'		

(二) 采样和样品处理:在进行 PCR 检测之前,首先要采样。目前样品主要有两个来源:一是尿液,二是细胞或粘膜分泌物。如取尿样,只需将收集到的初段尿放到灭过菌的容器中,不要加任何防腐剂。样品在室温下运输,4℃下可贮存达 96h。如取细胞或粘膜分泌物,一般用棉拭子或人造纤维拭子从粘膜上皮上采取,置于蔗糖磷酸盐缓冲液中,再加 2% 胚胎小牛血清和抗生素^[13],于 -70℃ 下可贮存 12~14h。DNA 的提取可用常规方法进行,如用 0.5% SDS 和蛋白酶 K 处理,酚氯仿抽提以及乙醇沉淀,经分光光度计定量,取 50~100ng 总 DNA 作 PCR 扩增^[9]。或样品中加 Nonidetp-40, Tween20 和蛋白酶 K 于 56℃ 处理 60min,再煮沸 3min 即可^[10]。或将样品置于小离心管煮沸 10min 后直接扩增,也能获得满意的效果^[14]。

(三) PCR 扩增:在反应缓冲液中加入 TaqDNA 聚合酶、4 种 dNTP、人工合成的引物和经过处理的样品液。PCR 的每一循环包括扩增特异性 DNA 双链的变性,引物与单链 DNA 互补序列的退火,以及在引物 3' 端以 DNA 链为模板进行延伸三个步骤。反应的变性温度为 95℃、退火温度为 60℃(各种 PCR 的退火温度不完全一样,甚至相差很大,这主要取决于引物的结构)。而第一循环于 95℃ 下 5min,使样品 DNA 充分变性,然后于 60℃ 下退火 1min,以后都是 95℃ 下变性 30s,60℃ 退火 1min。经 30 个循环后于 72℃ 下 5min 后加变性溶液。实验各步骤的温度和时间随引物的(C+G)%和扩增片段的长度等因素而定。此外,影响 PCR 扩增效率的因素还有: TaqDNA 聚合酶的浓度,待扩增 DNA 的浓度,以及 Mg²⁺ 等物质的浓度。扩增产物可作 2% 琼脂糖电泳或 10~

12%PAGE电泳,加溴乙锭显色或先将扩增物经适当的限制酶消化后再作电泳。根据凝胶上出现的清晰的DNA扩增带的位置,可直接判定结果。

由于引物不一样,PCR扩增的DNA片段的长度就不一样,甚或相差很大。L. Ostergaard^[10]设计的两对不同的质粒引物,它们的扩增片段长度分别为503bp和473bp(见附表)。J. E. Bauwens^[15]设计了一对质粒引物,其扩增片段长为207bp。R. Roosendaal^[17]分别根据质粒,主要外膜蛋白基因和16srDNA设计出三对引物,它们的扩增片段长度分别为201bp、129bp和310bp。Welch等^[16]根据7.5kb质粒ORF-1序列设计一对引物,扩增片段长度为137bp。可见PCR扩增片段的长度,主要取决于实验所设计的引物。

三 PCR检测的准确性

最早检测*C. t*的方法是用碘染色后检测细胞内的包涵体,由于其敏感性差(大约40%),现在已很少使用。细胞培养法,虽敏感性和特异性都较高,但仅限于检测有症状的患者,且较费时、费力,对条件和技术要求很高。但由于细胞培养法极少有假阳性,从而一直被奉为评价非培养法的“金标准(golden standard)”。直接荧光抗体测定(DFA)特异性好,易操作,敏感性也较高,但在辨认原生小体数或背景荧光时易受主观因素的影响。酶联免疫吸附试验(ELISA)操作较简单,检测的速度也很快,但有时敏感性相对较低^[10]。DNA探针法,虽敏感性和特异性都很高,但由于标记有³²P同位素,而使它的使用受到限制。

PCR法是一种非细胞培养检测*C. t*的方法。它具有较高的敏感性和特异性:J. E. Bauwens等^[15]对365份尿样分别进行PCR检测和细胞培养检测,结果细胞培养的敏感性和特异性分别为85%和100%,而PCR检测分别为97%和99.7%。L. Ostergaard等^[10]对228份样品进行检测,PCR技术的敏感性为

100%,特异性为93%,而细胞培养方法的为79%和100%。当PCR运转40个循环时,其敏感性可达到 10^{-17} gDNA,这个数值相当于一个拷贝的质粒,而正常*C. t*细菌内质粒的拷贝数为10左右。R. Roosendaal等^[17]设计了三对引物分别扩增质粒,MOMP基因和16srDNA,对13例经细胞培养显不同程度阳性的病人进行检测。结果质粒引物的敏感性最高。同时他们把这三种引物PCR与MIF和细胞培养法进行了比较。4例MIF和细胞培养以及质粒引物PCR呈阳性的病人(其中3例MOMP基因和16srDNA PCR呈阳性,另一例呈阴性),经一星期的治疗后,MIF、细胞培养、MOMP基因PCR以及16srDNA PCR都呈阴性,而在1~3周内,质粒PCR检测结果有三例阳性,这表明PCR技术的准确性是较高的,而且不同来源的引物其敏感性不一致。范俊等^[18]以内源性质粒引物对28份试样进行PCR检测,与ELISA比较,前者的灵敏度远较后者高。G. Jaschek等^[19]把PCR技术与比色微量孔技术结合起来。用生物素标记的引物扩增,然后将变性的扩增产物加到含有捕获探针CP₃₅的微量孔中,杂交、洗涤、再加亲和素——辣根过氧化物酶结合物,洗去多余的结合物,再加过氧化氢和四甲基联苯胺作为辣根过氧化物酶底物,反应10min,中止反应。读A₄₅₀的光密度。大于0.25的为阳性,小于0.25的为阴性,他们用这种方法对530份尿样进行检测,与细胞培养相比,其敏感性和特异性分别为94%和99.8%,而细胞培养的敏感性和特异性分别为68.4%和100%,这种方法不仅准确率高,而且省去了电泳这一步骤,从而使检测起来更加快速。以上实验证明,PCR技术在检测*C. t*时具有高度的敏感性和特异性。

由于PCR技术具有高度的敏感性,易出现假阳性现象。所以防止污染是保证PCR技术高准确性的一个重要环节。

(下转第42页)

共3批酶标抗体:第1批 CB_8 1:800 de_7 1:400;第2批 CB_8 1:1600 de_7 1:400;第3批 CB_8 1:800 de_7 1:200。

二、用ELISA对500份鲜奶样品进行检测,得到阳性结果7份,其阳性检出率为1.4%,同时做常规方法检测,其阳性数6份,阳性检出率为1.2%。

$$\text{敏感性} = \frac{\text{真阳性数}}{\text{真阳性数} + \text{假阴性数}} \times 100\% = \frac{6}{6+0} \times 100\% = 100\%$$

$$\text{特异性} = \frac{\text{真阴性数}}{\text{真阴性数} + \text{假阳性数}} \times 100\% = \frac{493}{493+1} \times 100\% = 99.7\%$$

$$\text{符合率} = \frac{\text{真阳性数} + \text{真阴性数}}{\text{样品总数}} \times 100\% = \frac{6+493}{500} \times 100\% = 99.8\%$$

小结与讨论

一、本次试验是应用沙门氏菌属特异单克隆抗体建立的直接ELISA方法,对鲜奶中的沙门氏菌进行了检验,对检测结果进行分析,得出检测鲜奶样品时该方法的敏感性为100%,特异性为99.7%,与国标方法相比,两者的符合率为99.8%。说明该方法对检测牛奶中的沙门氏菌可靠实用。以直接ELISA方法检测沙门氏菌仅需2~3天,比国标方法缩短了约一半时间,且节省大量试剂,降低检验成本。特

(上接第50页)

参考文献

1. WHO working group: *Bull. WHO* 1986; 64: 481
2. 赵季文等: *中华流行病学杂志* 1992; 13: 216
3. 宁波等: *中国人兽共患病杂志* 1994; 10 (3): 23
4. Ryan GM, et al: *Am. J. Obstet Gynecol.* 1990; 162: 34
5. Frutos R, et al: *J. Bacteriol.* 1989; 171: 4511
6. Weibueg WG, et al: *J. Bacteriol.* 1986; 167: 570
7. Spiprakash KS, et al: *Plasmid.* 1987; 18: 205
8. Hamilton PT, et al: *Nucleic. Acids. Res.* 1989; 17: 8366

别适合于大量样品的快速筛选的需要。

二、在500份未消毒鲜牛奶中,我们用直接ELISA方法检测时,阳性样品数比国标方法多1份,后经再用国标方法复检时,证实是沙门氏菌,说明常用的国标方法存在漏检。其原因系国标方法检测程序繁多,当检样中细菌数量少时,不易检出。

三、用直接ELISA方法之前,对被检样品中的细菌需用M—肉汤增菌6~10h,其目的主要使沙门氏菌的鞭毛充分发育,提高直接ELISA的检出率,消除样品中的杂质的非特异性干扰。

参考文献

1. Russell S, et al: *Food. Technology* 1988; 42 (4): 182
2. 王志亮等: *江苏农学院学报*, 1993; 14 (2): 55
3. 焦新安, *实验室手册*, 江苏农学院, 1993, P63~66
4. Thomason, B. H: *Applied Microbiology* 1971; 22: 1064
5. Stewart, B. J, et al: *Applied and Environmental Microbiology* 1980; 40: 223
6. Kryszinski B, L Heimsch: *Applied and Environmental Microbiology* 1977; 33: 947
7. Fiffs, R, et al: *Applied. Microbiology* 1983; 46: 1146
8. Adc, Pluit et al: *Applied and Environmental Microbiology* 1993; 59: 1342
9. Claas HC, et al: *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 42
10. Ostergaard L, et al: *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 1254
11. Andeasen AA: *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 244
12. Guatelli JG, et al: *Clin. Microbiol. Rev.* 1989; 2: 217
13. Gaydos CA, et al: *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 1541
14. Holland SM, et al: *J. Infect. Dis.* 1990; 162: 984
15. Bauwens JE, et al: *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 3013
16. Welch D, et al: *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56: 2494
17. Roosendaal R, et al: *J. Med. Microbiol.* 1993; 38: 426
18. 范俊等: *中国人兽共患病杂志*, 1994; 10 (2): 8
19. Jaschek G, et al: *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 1209