

## 人结核分枝杆菌特异性核酸 探针制备及结核病 PCR 检测技术的初步临床应用

蔡宏 陈东<sup>1</sup> 徐治新<sup>2</sup> 李君莲<sup>2</sup> 周文来

(新疆畜牧科学院兽医研究所 乌鲁木齐 830000)

(北京农业大学农业生物技术实验室 北京 100094)<sup>1</sup>

(新疆结核病研究所 乌鲁木齐 830000)<sup>2</sup>

**摘要** 采用人结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis* TB) 染色体 DNA 为模板, 选择位于插入片段 IS6110 中 884~865 和 568~588 碱基对处的两个片段为引物, 扩增出 317bp 的特异性片段, 将其克隆进 pUC19 载体。酶切图谱分析和 DNA 序列测定证实为目的片段。该片段经 DIG 标记, 分别与 11 种分枝杆菌 DNA 进行 Southern 杂交, 结果证明只与人型复合分枝杆菌发生杂交反应。利用该对引物建立的 PCR 检测技术对 74 份结核病痰液标本进行检测, 并与临床细菌快速培养结果相比较, 发现 48 份临床阳性均为 PCR 阳性, 在 26 份临床阴性标本中亦发现 11 份 PCR 检测阳性。将标本 PCR 产物与克隆探针进行杂交, 显示两者结果完全一致。说明 PCR 检测体系结果可靠, 其灵敏度明显高于目前临床所采用的方法, 可作为一种常规技术用于结核病的临床检测。

**关键词** 人结核分枝杆菌, 特异性核酸探针, PCR, 结核病检测

人结核杆菌病是一种古老的慢性、消耗性传染病。工业革命时期, 因其普遍流行且死亡率极高而被称为“白疫”。随着人们生活条件和医疗卫生水平的改善, 使结核病的发病率逐年下降。因此有人乐观地预计到 2000 年将在世界范围内彻底消灭结核病。但目前人结核杆菌病有日益加重的趋势, 并再次成为严重危害人类健康的疾病之一。去年初 WHO 预测从 1990~1999 年本世纪的最后 10 年内, 全球至少有 3000 万人死于结核病。而我国目前有结核病患者 600 万人, 每年因治疗不及时造成 25 万余人死亡。因此利用更加快速有效的方法进行结核病诊断成为当务之急<sup>[1,2]</sup>。

结核杆菌病常规诊断方法多采用的有显微镜观察抗酸杆菌, 细菌培养, BACTEC 快速培养法和酶联免疫吸附试验等。上述方法分别存在着特异性差、耗时长、成本昂贵及灵敏度低等问题, 尚难以达到临床诊断所需的灵敏、特异、快速且成本低廉等要求。

核酸探针技术的应用和发展为快速诊断疾病提供了一条新途径。Robert 等报道以全染色体 DNA 为探针可以快速诊断人结核杆菌临床分离株和禽型分枝杆菌<sup>[3]</sup>。近几年又在人型复合分枝杆菌中发现了一些插入序列, 利用这些插入序列进行菌株的限制性酶切片分析, 或者利用 RCR 扩增技术进行检测。其中插入序列 IS6110 属于结核杆菌类特异性基因片段, 在人结核杆菌染色体中含 6~20 个拷贝, 在牛结核杆菌中含 1~5 个拷贝<sup>[4]</sup>。国外已普遍采用该片段作为探针对人结核病进行鉴定和诊断。目前国内亦有该方面的 PCR 的检测试剂盒出售。由于所选定的核酸片段与反应条件尚有缺陷, PCR 在临床检测

中普遍反映特异性及灵敏性不理想。

本文利用 IS6110 的序列为模板合成引物, 扩增出特异片段, 从而制备出人结核杆菌 DNA 探针。并建立了相应的结核病 PCR 临床检验技术, 已初步应用于临床诊断。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌种: 人结核分枝杆菌 (TB) H37Ra 和 H37Rv, 牛结核分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*), 卡介苗分枝杆菌 (BCG), 草分枝杆菌 (*M. phlei*), 偶发分枝杆菌 (*M. fortuitum*), 转黄分枝杆菌 (*M. flavescens*), 胃分枝杆菌 (*M. gastri*), 瘰癧分枝杆菌 (*M. scrofulaceum*), 蟾分枝杆菌 (*M. xenopi*), 斯氏分枝杆菌 (*M. szulgai*) 等均购自北京结核病胸部肿瘤研究所细胞免疫学研究室。菌种的生化鉴定和培养由新疆结核病研究所完成。

1.1.2 生物制剂: 美国 Promega 产限制酶, 德国 Boehringer Mannheim 产 DIG Kit, 美国 Perkin Elmer 产 PCR Kit。

1.1.3 PCR 引物: 由北京大学生物系合成。分别位于 IS6110 的 884-865 和 568-588 处<sup>[5]</sup>, 序列如下:

引物 I: 5'-CCT. GCG. AGC. GTA. GGC. GTC. GG-3'

引物 II: 5'-TCA. GCC. GCG. TCC. ACG. CCG. CCA-3'

### 1.2 试验方法

1.2.1 细菌培养: 将标准菌原种转移至研磨管中, 加入少许磷酸盐缓冲液, 用磨棒充分研磨成悬液, 转移至改良的罗氏培养基, 于 37℃ 培养 4~8 周。

1.2.2 染色体 DNA 提取<sup>[6]</sup>: 将细菌培养物悬浮于 20ml TE 缓冲液 (pH8.0 中) 中, 80℃ 热灭活 30min, 4000g 离心 20min 收集细菌。加入 5ml 裂解液 (25% 蔗糖, 50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 50mmol/L EDTA, 500μg/ml 溶菌酶) 于 37℃ 保温 1h。再加入 5ml 新配制的消化液 (100mmol/L Tris-HCl, pH8.0), Proteinase K 400μg/ml, 1% SDS), 55℃ 温育 2h。加入 2ml 5mol/L NaCl 溶液, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀。离心收集 DNA 沉淀, 溶于 TE 中。

1.2.3 人结核杆菌特异性片段的 PCR 扩增<sup>[7]</sup>: 以制备的染色体 DNA 为模板, 利用合成的引物在 TaqDNA pol 作用下进行扩增。反应体系及条件如下: 50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 2.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, dNTP 各 200μmol/L, 引物各 1.0μmol/L, Taq DNA pol 2.5u, 模板 DNA 为 1.2μg, 加水至 100μl。

在 PE-9600 型扩增仪上进行 35 次循环: 94℃/2min 20s, 72℃/3min 25s。待反应结束, 将 PCR 产物降温至 0℃, 取出 20μl 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。在剩余反应液中加 10u T4DNA pol, 100μmol/L dNTP, 1/10 体积修补缓冲液, 37℃ 保温 5min 以补平 PCR 产物末端。DNA 纯化后备用。

1.2.4 扩增片段的克隆与转化: 将 pUC19 DNA 用 Sma I 消化, 再用碱性磷酸酶处理载体 DNA。于 10μl 反应体系中加入载体 DNA 和 PCR 产物各 1μg, 5u T4DNA ligase 于 16℃ 保温过夜。按常规转化方法将连接产物转化至 *E. coli* JM107。挑选白色重组体克隆, 提取 DNA 进行电泳检测。

1.2.5 重组子的鉴定<sup>[8]</sup>:常规方法提取重组子 DNA,分别用 BamH I, EcoR I /Hind III, Sal I, Pvu I 消化,1.5%琼脂糖电泳检测,建立酶切图谱。利用核酸自动测序仪分析插入片段的序列。

1.2.6 克隆片段的特异性分析:分别提取人结核分枝杆菌(TB) H37Ra 和 37Rv 株、牛结核分枝杆菌、卡介苗分枝杆菌、草分枝杆菌、偶发分枝杆菌、转黄分枝杆菌、胃分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、蟾分枝杆菌、斯氏分枝杆菌的染色体 DNA,各取 1 $\mu$ g 用 Pvu I 消化,0.5%凝胶电泳,真空转移至尼龙膜。以 DIG-dUTP 标记 BamH I 消化的重组子中的 317bp 特异核酸片段 DNA 为探针,与 DNA 膜于 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜(50ng/ml 的 DNA 探针);清洗,结合碱性磷酸酶/抗体复合物进行显色反应。观察显色条带,确定探针的特异性。

1.2.7 人临床结核标本 DNA 提取:将收集的待检痰液于 100 $^{\circ}$ C 热灭活 10min,与等体积的 1mol/L NaOH 混合,室温静置 20min;取 1ml 于 12000r/min 离心 10min,收集细菌沉淀。按 1.2.2 方法提取 DNA。

1.2.8 临床标本 DNA 的 PCR 检测:以上述标本 DNA 为模板,按 1.2.3 的条件与方法进行 PCR 扩增,取 20 $\mu$ l 进行电泳检测。同时将各份扩增产物与克隆探针进行 Dot-blotting,以确证 PCR 扩增的可靠性。

## 2 结果与分析

### 2.1 人结核杆菌特异性片段的扩增及克隆

应用特异性引物进行 PCR 扩增,电泳检测显示,扩增产物长度与预计的 317bp 非常接近(见图版 I-A)。将 0.5 $\mu$ g 重组体 DNA 转化 JM107,得到 73%的重组克隆。

### 2.2 重组子的鉴定

用 5 种限制酶消化重组体 DNA 以建立酶切图谱(见图版 I-B),结果表明与理论图谱完全一致(见表 1)。

表 1 克隆片段的酶切图谱分析

Table 1 Analysis of restriction map of cloned fragment

Enzyme	Theoretical size of the restriction fragment	Determined size of the restriction fragment/bp
Sal I	2930/73	2930
EcoR I /Hind III	2685/368	2685/368
BamH I	3003	3003
Pvu I	2364/639	2364/639

序列分析结果显示(见表 2)克隆的 317bp 片段的核苷酸序列与文献报道完全一致。由上述结果可见,所克隆的 PCR 扩增产物即为所需的目的片段,将其命名为 HD15。

表 2 克隆片段的序列分析结果

Table 2 The DNA sequence of cloned fragment

5'-	TCAGCCGCGT	CCACGCCGCC	ACTACGGTGT	TTACGGTGCC	CGCAAAGTGT	GGCTAACCT	GAACCGTCAG
	GGCATCGAGG	TGGCCAGATG	CACCGTCGAA	CGGCTGATGA	CCAAACTCGG	CCTGTCCGGG	ACCACCGCG
	GCAAAGCCCG	CAGGACCAGG	ATCGCTGATC	CGGCCACAGC	CCGTCCCGCC	GATCTCGTCC	AGCGCCGCTT
	CGGACCACCA	GCACCTAACC	GGCTGTGGGT	AGCAGACCTC	ACCTATGTGT	CGACCTGGGC	AGGGTTCGCC
	TACGTGGCCT	TTGTACCCGA	CGCTACGCT	CGCAGG			

### 2.3 克隆片段的特异性分析

DIG 标记的 HD15 DNA 片段, 经检测其灵敏度达 0.1pg。再分别与 1 $\mu$ g 经 Pvu II 消化的 11 种分枝杆菌染色体 DNA 进行 Southern 杂交, 结果表明 HD15 只与牛和人结核分枝杆菌呈现明显的杂交信号(见图版 I-C), 而与其它分枝杆菌没有交叉反应。说明 HD15 是针对牛和人结核分枝杆菌的特异性探针。

### 2.4 临床痰液标本 DNA 的 PCR 检测

以前述方法对痰液 DNA 进行 PCR 检测, 同时与临床细菌快速培养检测结果相比较。结果发现 48 份临床阳性样品均为 PCR 阳性, 在 26 份临床阴性样品中亦发现 11 份 PCR 阳性(见图版 I-D)。

将各样份 PCR 产物 1 $\mu$ l 与 HD15 探针进行 Dot-blotting, 同时以 1pg 的 HD15 DNA 作为阳性对照。结果显示杂交结果与 PCR 完全一致(见图版 I-E), 说明 PCR 阳性均来源于标本中的结核分枝杆菌。

上述结果说明本试验所建立的结核病 PCR 检测技术可以应用于临床工作, 其灵敏度和特异性高于目前所采用的常规检测方法。

## 3 讨 论

由于分枝杆菌属染色体 DNA 中 G+C 含量高达 65%, 每次 PCR 循环均需高温变性 & 复性, 对 Taq pol 的活性影响很大, 故采用两步循环法, 以尽量缩短反应时间。

由实验结果可见, 克隆出的 HD15 探针与人型、牛型结核分枝杆菌 DNA 均可杂交。由于这两种菌型在人和牛中交互感染, 因此 HD15 探针可同时检测出标本中的两种类型杆菌, 避免了漏检。由于插入序列 IS6110 在人结核杆菌含 6~20 个拷贝, 在牛一般只含 1 个拷贝, 故 IS6110 检测人型结核杆菌的效果优于牛型。

本试验建立的结核病 PCR 检测技术其灵敏度和特异性高于目前所采用的常规检测方法, 不仅避免了漏检, 同时还在临床检验判定为阴性的标本中发现了部分 PCR 阳性, 这是由于部分健康人被结核菌感染后, 处于不发病的隐性带菌状态。这种情况由于不需进行治疗, 在临床一般定为阴性。因此本试验所建立的结核病 PCR 检测体系需进一步调整其灵敏度以与目前临床所采用的判断标准相一致, 既避免漏检, 又不会造成“假阳性”的出现。

## 参 考 文 献

- [1] F M Collins. *Veterinary Microbiology*, 1994, 40: 95~110.
- [2] Perer W M, Hermans, A R J Schuitema, D van Soolingen *et al.* *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28 (6): 1204~1213.
- [3] Roberts M C. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25: 1239~1243.
- [4] Collins D M, Erasmuson S, Stephens D M *et al.* *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31 (5): 1143~1147.
- [5] Frederick S Nolte, Beverly Metchock, John E, McGowan J R *et al.* *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31 (7): 1777~1782.
- [6] Takewaki S I, Okuzumi K, Ishiko H *et al.* *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31 (2): 446~450.
- [7] Clarridge J E, Shawar R M, Shinnick T M *et al.* *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31 (8): 2049~2056.
- [8] Thierry D, Cave M D, Eisenach K D *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1989, 18 (1): 188.

## The Preparation of *Mycobacterium tuberculosis* Specific Probe and the PCR Diagnosis of Human Tuberculosis

Cai Hong Chen Dong<sup>1</sup> Xu Zhixin<sup>2</sup> Li Junlian<sup>2</sup> Zhou Wenlai

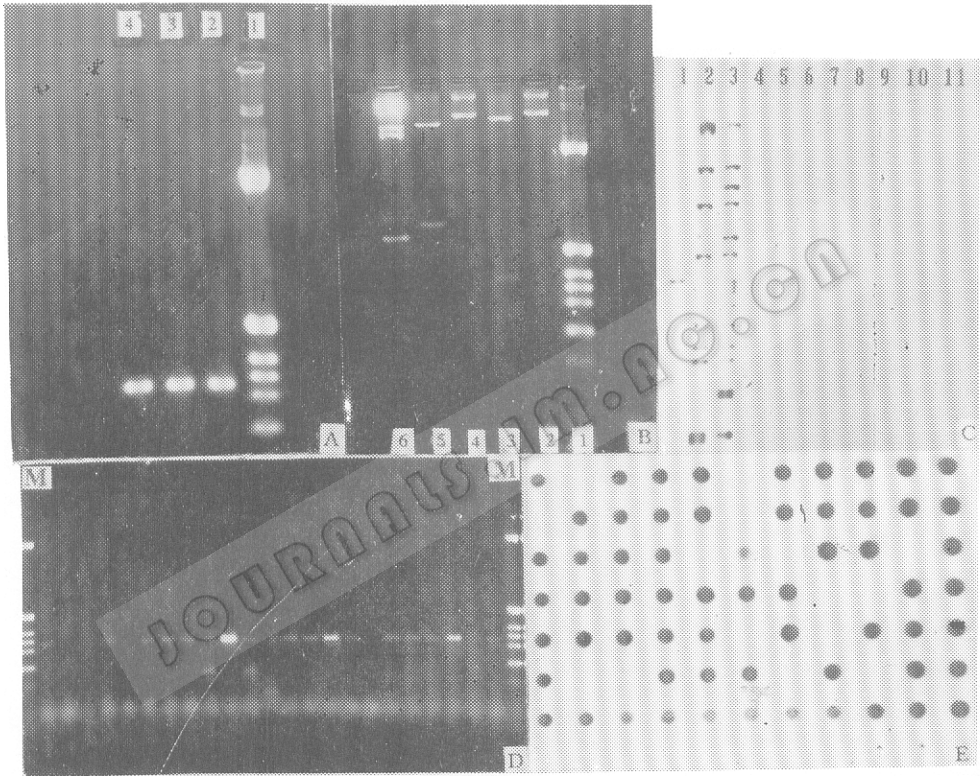
(Institute of Veterinary, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000)

(National Lab. for Agrobiotechnology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)<sup>1</sup>

(Xinjiang Institute of tuberculosis, Urumqi 830000)<sup>2</sup>

**Abstract** *Mycobacterium tuberculosis* (TB) is the pathogenic bacteria of human tuberculosis. A specific fragment of IS6110, an insert sequence repeated multiple times in the chromosome of *M. tuberculosis* was used as template to amplify a 317bp through PCR technique. The 317bp fragment was proved as a specific probe for *M. tuberculosis* but not for other mycobacterium in the Southern blot. A PCR assay for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis was developed by using above primers. The PCR results were compared with the clinical bacteria culture for the detection of *M. tuberculosis* in 74 sputum samples. 48 positive samples were found in the culture and all of those were PCR positive. Another 16 PCR positive sputum were seen in 26 negative cultures. We proved that all the positive PCR products could hybridize with cloned probe through Dot-blotting. The specific DNA probe prepared in this experiment provided the material for the research of epidemiology and molecular biology of *M. tuberculosis*. The PCR assay set up here offered a sensitive and specific technique for the diagnosis of human tuberculosis.

**Key words** Human *M. tuberculosis*, specific DNA probe, PCR, diagnosis



A. PCR amplified product of specific fragment of *Mycobacterium tuberculosis*

1. pBR322/Hinf I Marker    2. H37Ra template    3. H37Rv template    4. *M. bovis* template

B. Restriction enzyme analysis of recombinant DNA

1. pBR 322/Hinf I Marker

2~5. The digestion of HD15 with BamH I , EcoR I /Hind III , Sal I and Pvu II respectively

6.  $\lambda$ /Hind III Marker

C. Southern hybridization of 11 tuberculosis DNA digested with Pvu II to HD15 probe

1. *M. bovis* DNA    2. H37Rv DNA    3. H37Ra DNA    4. Other 9TB DNA

D. The partial result of PCR detection of tuberculosis sputum samples

M. pBR322/Hinf I marker.

Others; sputum samples

E. The Dot hybridization of PCR product of tuberculosis sputum samples with the probe of HD15