

基因扩增技术在病原菌基因检测中的应用

军事医学科学院微生物流行病学研究所* 林万明 李建标 徐健雄 杨瑞馥

为了跟踪世界上微生物鉴定技术的最新进展,我们从第六届微生物与免疫快速和自动化检测方法国际学术会议中,挑选出有关基因扩增技术在病原菌基因检测中的应用部分内容介绍给大家。

一、用基因扩增法快速鉴定分枝杆菌:双向聚合酶级联反应(bidirectional polymerase cascade reactions)能成百倍地扩增特异的核酸序列,用这种技术检测和鉴定了结核杆菌和麻风杆菌。使用四对位于65KDa抗原部分基因内的巢居引物进行PCR试验,而不需要核酸探针。巢居引物法很敏感,可扩增仅含3fg基因组DNA的样品。在特异性方面,可以从混有10⁶拷贝的结核杆菌65KDa抗原基因中特异地扩增10拷贝的麻风杆菌65KDa抗原基因,反之亦然;用19个其它分枝杆菌菌种、19种非分枝杆菌、鼠细胞和人细胞来扩增均阴性。用本实验的快速、简单裂菌法可检测感染动物和人活检组织中的麻风杆菌和结核杆菌。从样品制备到数据分析可在8小时内完成。

二、应用PCR扩增细菌核酸和直接测序来鉴定分枝杆菌培养物:据表型鉴定分枝杆菌麻烦、费时。对十几种主要人类致病的分枝杆菌小亚单位rRNA序列比较后,确定了分枝杆菌种特异的寡核苷酸。依据其16S rRNA核苷酸结构可区别每一分枝杆菌菌种。

三、扩增编码32KD蛋白质的基因片段检测和鉴定分枝杆菌:使用编码32KD分泌蛋白的基因作为靶序列,并证实这种蛋白质对分枝杆菌特异。据已发表的基因序列选择一对引物和一个探针。21mer引物分别位于该基因423bp区域的两侧,21mer的探针则与423bp区域内某段序列互补,这一序列在结核杆菌和BCG中变异最大。用苯酚-氯仿法从SDS处理的分枝杆菌中提取的DNA经30次循环扩增后,琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色检测产物。用³²P5'末端标记的探针作常规Southern印迹分析。所有10株结核杆菌都在AGE中获得了明显的期望带,其敏感性为0.05pg。试验的20个种的25株分枝杆菌,除戈氏分枝杆菌外,都为阳性结果。探针与10株结核杆菌杂交,但不与其它分枝杆菌杂交,所有非分枝杆菌均为阴性。

四、用临床标本进行PCR快速诊断分枝杆菌感

染:用PCR试验检测和鉴定分枝杆菌已研制成功,一种方法是扩增结核杆菌复合物特异的重复插入序列IS6110,另一种是扩增编码分枝杆菌65KD抗原基因的部分序列,然后用扩增的片段同种特异的寡核苷酸探针杂交,能够鉴定结核杆菌、鸟分枝杆菌、副结核杆菌、堪萨斯分枝杆菌和意外分枝杆菌。这些试验已用来检测各种来源的临床标本(如痰、消化道抽提物、脑脊髓液、活组织检查、血液、尿等)中的结核杆菌和鸟分枝杆菌。80份标本的检测结果同临床和微生物学的资料符合良好。

五、百日咳杆菌重复DNA序列的分析及其在PCR诊断百日咳中的应用:将百日咳杆菌1046bp重复序列DNA克隆到*E.coli* K12。该片段能与所有100株百日咳杆菌临床分离株产生很强的杂交,并与支气管炎杆菌的单拷贝序列具有同源性,而与副百日咳杆菌则无同源性。该片段也不与巴斯德杆菌属、产碱杆菌属和嗜血杆菌属发生印迹杂交。选择重复序列内相距153bp片段的两端合成互补的引物,用PCR法来扩增这一区域。用该法快速检测(5h)323例可疑百日咳儿童的鼻咽分泌物中的百日咳杆菌。30次PCR循环后用琼脂糖电泳,溴乙锭染色检测特异的PCR产物。结果表明,PCR法有92份标本阳性,而培养法65份阳性,直接免疫荧光法(IF)31份阳性。所有IF阳性标本PCR均阳性;培养阳性标本中有58份PCR阳性,7份PCR阴性标本中长出的菌落数不到5个;224份培养和IF阴性的标本PCR检测也阴性,33份培养与IF阴性的标本PCR检测阳性。PCR总敏感性93%,而培养法为66%,IF是31%。因此,用PCR法扩增百日咳杆菌特异的DNA序列是实验室诊断百日咳快速、特异、高度敏感的方法。

六、用PCR扩增和非标记探针竞争法评价培养和探针杂交结果不一致的沙眼衣原体标本:PACETM2沙眼衣原体(PACE 2 CT),是一种能直接检测泌尿生殖道标本中沙眼衣原体rRNA的DNA探针实验,用该法检查了1554例病人的宫颈拭子,并和培养方法

* 北京, 邮政编码 100071

作了比较。PACE 2 CT鉴定92.2%(141/153)培养阳性的病例及98.4%(1379/1401)培养阴性的病例。通过下列方法对培养阴性/探针阳性的标本作进一步分析:

1. 探针竞争试验(PCA): 在杂交反应中加入100倍摩尔数过量的非标记探针, 测定对杂交结果的作用。

2. PCR系统: 采用质粒和rRNA基因序列。22例培养阴性/探针阳性标本中有17份可用PCR法检测。当非标记探针加入杂交系统时, 17份标本中有16份的杂交信号降低80%以上。在20份进行PCR的标本中, 有18份扩增出了沙眼衣原体种特异的质粒和rRNA基因产物带。

这些结果证实: 19份培养阴性/杂交阳性标本含有沙眼衣原体特异的核酸, 确实为阳性标本。PACE 2 CT的可靠敏感性和特异性分别为93.0%(160/172)和99.8%(1379/1382)。

七、非放射性DNA杂交中使用微波检测食品中的细菌: 在菌落杂交中微波可以快速溶解多种纯化的细菌。人工造成污染多种携带产TEM_B-内酰胺酶质粒基因的革兰氏阴性细菌的食品, 将粗的污染食品标本点到尼龙膜上, 在1.5mol/L NaCl和0.5mol/L NaOH中经微波辐射, 与生物素标记的TEM_B-内酰胺酶序列特异探针杂交, 每一斑点可检出超过10⁴的细菌, 检测10种食品标本效果良好。

八、用DNA探针诊断丝虫: 目前世界上热带地区

大约有30亿人遭受丝虫感染。在非洲引起失明的肠扭转盘尾丝虫和在亚洲引起象皮病的马来布鲁丝虫和班氏吴策丝虫均可用探针检测。克隆马来布鲁丝虫和Pahangi布鲁丝虫的一组重复序列DNA并进行测序。322个碱基对的重复家族占整个基因组的10%, 尽管重复序列中平均有90%相同; 但有些可变区仅有72%相同。用这个可变区构建种特异性的寡核苷酸探针, 在印度尼西亚现场将DNA探针和传统的马来布鲁丝虫和Pahangi布鲁丝虫鉴定法作比较。从感染的人和猫均分离到了丝虫, 两种方法的鉴定结果98%一致。结果证明布鲁丝虫属的两个种均可感染猫, 而只有马来布鲁丝虫能感染人类。

九、与无乳支原体和牛支原体16S rRNA互补的合成寡核苷酸探针在支原体膜杂交中的应用: 将牛支原体和无乳支原体的16S rRNA用逆转录酶以双脱氧法作部分测序。这两种支原体的核酸序列在V8区相同, V8区在进化上是高度变异的决定区。合成的寡核苷酸探针为30个碱基, 同牛支原体和无乳支原体V8决定区的亚区互补。标记的寡核苷酸探针与点到硝酸纤维素膜上的支原体杂交。牛支原体和牛生殖道支原体杂交呈强阳性, 绵羊和公山羊唯一的无乳支原体也呈强阳性。该探针不能用于鉴别牛支原体和牛生殖道支原体, 但对检测和鉴定山羊和绵羊标本中的无乳支原体, 该法是有价值的。

自急性腹泻病人粪便中分离出豚鼠气单胞菌

解放军第三〇五医院* 王玉玲

1989年夏, 本实验室自急性腹泻患者粪便中检出一株豚鼠气单胞菌。鉴定结果报告如下。

此菌在SS平板上菌落无色、半透明, 在血平板上呈大而扁平、β溶血的褐色菌落, 略有臭味, 普通琼脂上生长。革兰氏染色为直或略弯的阴性杆菌。氧化酶阳性, 触酶弱阳性, 葡萄糖O/F为发酵型, 极鞭毛。双糖斜面: 葡萄糖阳性, 乳糖阴性, 不产气、有动力。精氨酸脱羧酶、精氨酸水解酶阳性, 分解甘露醇、水杨素、蔗糖、葡萄糖, 阿拉伯糖产酸。硝酸盐

还原、吲哚试验及七叶苷和胆汁七叶苷水解均为阳性。无盐胨水及3% NaCl胨水呈混浊生长。不分解甘露糖、肌醇、山梨醇, 不水解尿素, 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、VP反应及H₂S均为阴性。在6%、8%、10% NaCl胨水中不生长。

鉴于本菌株VP试验阴性, 分解葡萄糖不产气, 分解阿拉伯糖, 水杨素产酸, 水解七叶苷这五项试验结果, 恰与豚鼠气单胞菌的特征完全相符。

* 北京, 邮政编码 100017