

研究工作

PCR 扩增人型结核杆菌 DNA 及结核杆菌属 DNA 探针的制备

丁晓华 杨 平 刘薇茜 谭 云 赵文先

(湖北医学院病毒研究所, 武汉 430071)

蔡建斌 梅国华 潘慧可

(武汉钢铁公司第二职工医院, 武汉 430085)

提 要

用多聚酶链反应 (PCR) 方法扩增人型、牛型结核杆菌基因组 DNA, 获得特异的 158 bp DNA 片段, 而从另外十三种分枝杆菌未见到特异的扩增产物. 回收 158 bp DNA 片段作探针, 它除与人型、牛型结核杆菌有特异的杂交信号外, 与金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌及一些分枝杆菌皆没有杂交反应. 结果表明, PCR 可用于检测结核杆菌基因组 DNA, 扩增产物 158 bp DNA 片段可作为探针用于检测人型、牛型结核杆菌并鉴别结核杆菌与其它分枝杆菌.

关键词 结核杆菌, 聚合酶链反应, 核酸杂交, DNA 探针

人型、牛型结核杆菌是引起结核病的病原菌. 在我国, 结核杆菌的感染十分常见, 各种结核病的发病率仍较高. 而目前结核病的实验室诊断没有十分理想的方法, 临床常用的痰涂片抗酸染色及结核杆菌培养皆不能满足临床工作的需要, 前者敏感性差且特异性低, 后者需培养 4 到 6 周才能获得结果, 而且检出率很低.

近年来, 随着分子探针及 PCR 技术的广泛应用, 国外有不少研究者使用 PCR 及核酸杂交技术检测并鉴定结核杆菌与其它分枝杆菌, 国内这方面的研究刚刚起步. 我们根据美国学者 Hermans 克隆的人型结核杆菌克隆株 pPH7301 的核苷酸序列及寡核苷酸引物序列^[1], 扩增了我国人型结核杆菌基因组 DNA 片段, 并回收这一片段作探针, 为 PCR 和分子探针检测结核杆菌及其临床应用奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 人型结核杆菌、牛型结核杆

菌及其它分枝杆菌, 由武汉钢铁公司第二职工医院保存.

1.1.2 引物

引物 1 5'GGTCCTGACGGTAATGGGGT3'

引物 2 5'CGCCCATCCACATCCCGCCC3'

引物 1 和引物 2 委托中国科学院上海细胞生物所合成.

1.1.3 酶及试剂 Taq DNA 聚合酶为华美生物工程公司产品; dNTP 为 Sigma 公司产品; DNase I 及 DNA 聚合酶 I; (α -³²p) dCTP 为北京福瑞生物工程公司产品; 硝酸纤维素膜为浙江黄岩化工厂产品.

1.2 方法

1.2.1 提取结核杆菌及其它分枝杆菌 DNA 从斜面培养基 (改良罗氏培养基) 刮取结核杆菌及分枝杆菌菌落约 1mg, 悬于 1ml 缓冲液 (50mmol/L Tris · HCl pH8.0, 5mmol/L EDTA) 中, 加溶菌酶至终浓度 1mg/ml, 37℃

保温 2h, 再加蛋白酶 K 和 10% SDS 至终浓度分别为 0.1mg/ml 和 0.5%, 继续保温 40min. 等体积苯酚/氯仿抽提 2 次, 氯仿抽提 1 次, 上清液用 2 倍体积的 95% 乙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤, 抽干, 溶于 50 μ l 消毒双蒸水中备用.

1.2.2 PCR 扩增结核杆菌基因组 DNA 片段 按文献[2]的方法进行. 在 50 μ l 总反应体积中含引物 1 和引物 2 各 25pmol, 25mmol/L Tris · HCl pH8.2, (NH₄)₂SO₄ 25mmol/L, MgCl₂ 1.5mmol/L, 明胶 2mg/ml, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 各 2mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 单位. 样品 DNA 于 97℃ 保温 10min, 冰浴中骤冷, 然后取 5 μ l 加到反应体系中, 开始 PCR 循环. 第一轮于 94℃ 保温 2min, 55℃ 保温 1min, 最后于 72℃ 水浴 1min; 第二轮 94℃ 水浴 1min, 然后转入 55℃ 水浴 30s, 72℃ 水浴 30s, 如此反复循环 35 次, 最后于 72℃ 保温 10min, 取出于 4℃ 保存. 取反应产物 10 μ l 走 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 (电泳胶含溴化乙锭 0.5 mg/ml), 电泳后在紫外灯下观察.

1.2.3 电洗脱人型结核杆菌 PCR 扩增的 DNA 片段 在紫外灯下用手术刀片将含人型结核杆菌的 158bp DNA 片段的凝胶切下, 将凝胶块放入 DF-17 型 DNA 电洗脱槽样品孔中, 80V, 100mA 电泳 1h, 回收 V 形管中含 DNA 的 7.5mol/L NH₄AC 溶液, 加 2 倍体积的 95% 冷乙醇沉淀 DNA, 75% 乙醇洗涤, 抽干, 溶于 10 μ l 消毒双蒸水中.

1.2.4 斑点杂交 将人型、牛型及其它分枝杆菌 DNA 5—10 μ g 点于处理好的硝酸纤维素膜上, 变性、中和后按文献[3]的方法与缺口平移标记的人型结核杆菌 158bp DNA 片段探针杂交.

1.2.5 DNA 印迹杂交 取 PCR 扩增产物 5 μ l 走 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 按文献[4]的方法吸印到硝酸纤维素滤膜上, 然后与人型结核杆菌 PCR 扩增的 158bp DNA 片段探针杂交.

2 结 果

2.1 结核杆菌 DNA 的 PCR 扩增

用多聚酶链反应扩增人型结核杆菌 DNA, 扩增产物电泳后可见清晰的 DNA 带, DNA 片段的长度为 158bp, 与设计的大小相符 (图 1).

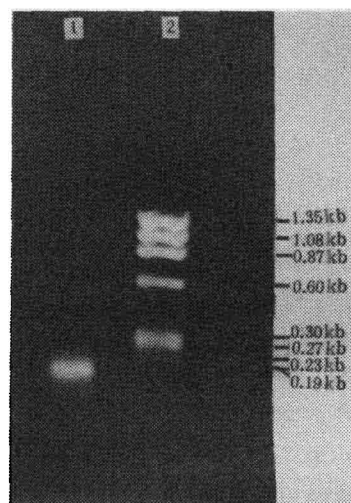


图 1 人型结核杆菌 DNA 的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of DNA of *M. tuberculosis*

1. 人型结核杆菌 DNA
DNA of *M. tuberculosis*
2. ϕ X174 DNA Hae III 酶切分子量标准
 ϕ X174 DNA Hae III marker

除人型结核杆菌外, 牛型结核杆菌也扩增出特异的 158bp DNA 片段. 胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌、牡牛分枝杆菌、金分枝杆菌、土分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、地分枝杆菌、偶发分枝杆菌、海分枝杆菌、淋巴结分枝杆菌、草分枝杆菌皆未见到相应扩增产物、金黄色葡萄球菌及绿脓杆菌也没有出现扩增片段.

2.2 结核杆菌及分枝杆菌 DNA 的斑点杂交

以回收的 158bp 片段作探针, 缺口平移标记后与点于硝酸纤维素膜上的各种来源的 DNA 杂交, 除人型、牛型结核杆菌可见明显的杂交信号外, 其它十三种分枝杆菌、金黄色葡

萄球菌、绿脓杆菌 DNA 样品没有出现杂交反应 (图 3)。

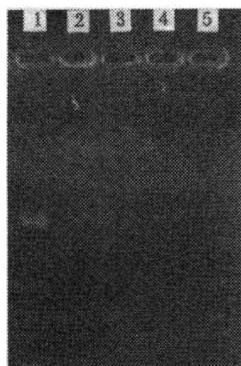


图 2 结核杆菌及对照 DNA 的 PCR 扩增
Fig. 2 Amplification of DNA of *M. tuberculosis*
and control DNA

1. 人型结核杆菌 *M. tuberculosis*
2. 牛型结核杆菌 *M. bovis*
3. 胞内分枝杆菌 *M. intracellulare*
4. 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*
5. 绿脓杆菌 *Bacillus pyocyaneus*

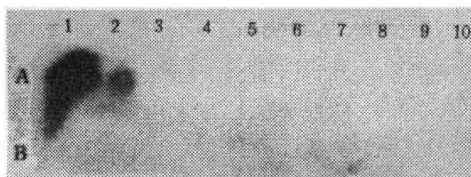


图 3 结核杆菌及其它分枝杆菌的斑点杂交结果
Fig. 3 Result of Dot blot of *M. tuberculosis*
and other mycobacteria DNA

- A1. 人型结核杆菌 *Mycobacterium tuberculosis*
- A2. 牛型结核杆菌 *Mycobacterium bovis*
- A3. 胞内分枝杆菌 *Mycobacterium intracellulare*
- A4. 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*
- A5. 绿脓杆菌 *Bacillus pyocyaneus*
- A6—10, B1—8. 其它分枝杆菌
Other mycobacteria

2.3 PCR 扩增产物的 DNA 印迹杂交

PCR 扩增产物用 DNA 印迹法吸印至硝酸纤维素膜上后与回收的 158bp 探针杂交, 除人型、牛型结核杆菌出现强的特异性杂交信号外, 胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌也可见到较弱的杂交信号, 金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、鸟分枝杆菌、耻垢分枝杆菌没有出现特异性杂交

反应 (图 4)。

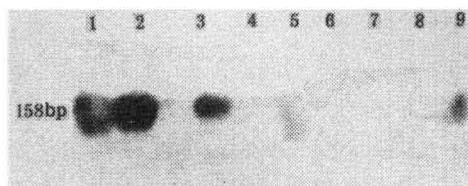


图 4 PCR 扩增产物的 DNA 印迹杂交结果
Fig. 4 Southern blot analysis of PCR amplified
DNA

1. 人型结核杆菌 *Mycobacterium tuberculosis*
2. 牛型结核杆菌 *Mycobacterium bovis*
3. 胞内分枝杆菌 *Mycobacterium intracellulare*
4. 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*
5. 绿脓杆菌 *Bacillus pyocyaneus*
6. 鸟分枝杆菌 *Mycobacterium avium*
7. 牡牛分枝杆菌 *Mycobacterium vaccae*
8. 耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis*
9. 堪萨斯分枝杆菌 *Mycobacterium kansasii*

3 讨 论

我们根据美国学者 Hermans 克隆的结核杆菌克隆株 pPH7301 的核苷酸序列和寡核苷酸引物序列, 成功地扩增了我国人型、牛型结核杆菌 DNA 片段, 扩增的特异 DNA 片段的长度为 158bp, 与设计的 DNA 长度相符, 金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌及其它十三种分枝杆菌没有见到相应的扩增产物, 这一结果表明, PCR 扩增的特异性良好, 这一靶基因为结核杆菌属所特有, 可作为 PCR 检测结核杆菌的靶 DNA 序列。

为了进一步检测这一人型结核杆菌 PCR 扩增片段作为分子探针的实用性, 它与其它分枝杆菌、革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性杆菌是否存在交叉反应, 分别用回收的 158bp DNA 探针进行斑点杂交和 DNA 印迹杂交。结果表明, 除人型和牛型结核杆菌外, 其它分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌没有杂交反应, 证明它们确实不存在同源序列。PCR 扩增产物的 DNA 印迹杂交与斑点杂交结果略有不同, 胞内分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌也出现了较弱的杂交反应。分析有两种可能, 一是非特异性扩增

产物产生的杂交信号,或是它们与结核杆菌存在部分同源序列,堪萨斯分枝杆菌为前者的可能性大。

由于结核杆菌的实验室检测目前缺乏敏感性高、特异性强、快速简便的方法,而PCR检测及分子探针杂交具有很好的敏感性和很高的特异性,有必要将这一方法用于临床结核病的实验室病原诊断。我们采用的多聚酶链反应检测结核杆菌DNA的方法具有良好的特异性,它与临床常见的金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌及其它分枝杆菌没有明显的交叉反应。回收的人型结核杆菌PCR产物158bp DNA片段作分子探针也具有同等的特异性。如将这一检测方法应用于临床实验室,将有很好的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Hermans P W M, Schuitema A R J, Soolingen D V *et al.* Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1990; **28**: 1204
- 2 Saiki R K, Gelfand D H, Stoffl S *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988; **239**: 487
- 3 Hames B D, Holland I B. *Nucleic acids hybridization, a practical approach*. Oxford Washington: Blackwell Scientific Publications, 1985; 78
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. New York: Spring Harbor Laboratory, 1989; 9. 31

The Amplification of *Mycobacterium Tuberculosis* DNA by PCR and The Preparation of DNA Probe of *Mycobacterium Tuberculosis*

Ding Xiaohua Yang Ping Liu Weiqian Tan Yun Zhao Wenxian

(Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan 430071)

Cai Jianbin Mei Guohua Pan Huike

(The Second Hospital, Wuhan United Steel Co., Wuhan 430085)

ABSTRACT

The DNA of *Mycobacterium tuberculosis* is amplified by polymerase chain reaction and we get a specific 158 bp DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis*. The DNA of *Mycobacterium bovis* is also amplified, but other thirteen mycobacteria are not. The DNA fragment is recovered and used as a DNA probe. It can hybridizes with DNA of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*, but not with the DNA of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pyocyaneus* and other mycobacteria. This result suggests that the *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* can be detected by PCR and the amplified 158 bp DNA fragment can be utilized as a molecular probe. This probe can examine the *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* and distinguish them from other mycobacteria.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*, polymerase chain reaction, nucleic acid hybridization, DNA probe