

应用光敏生物素标记核酸探针鉴定分枝杆菌的研究

田润芝 孙茹芹 王玫芬 王玉铭 王丽华 韩 珍

(哈尔滨市结核病防治所, 哈尔滨 150076)

摘要 用光敏生物素标记非结核分枝杆菌临床分离株及标准分枝杆菌全染色体 DNA 制成探针, 与已知标准牛分枝杆菌 (BCG 株) 及不同种的非结核分枝杆菌 DNA 杂交, 可快速将分支杆菌鉴定到种, 同时以大肠埃希氏菌做阴性对照, 显示良好的特异性和准确性。此种方法具有鉴定速度快、操作简便、稳定性好及对人体无害等特点, 适用于结核杆菌和非结核分枝杆菌的菌种鉴定。

关键词 分枝杆菌, 光敏生物素标记核酸探针, DNA-DNA 杂交, 鉴定

多年来, 分枝杆菌的菌种鉴定工作, 一直采用传统分枝杆菌分类菌种鉴定技术, 用此方法通常需要 6—8 周的时间, 费工、耗时, 已不适应临床需要。近年来, 引进的 Bactec 460 TB 系统^[1], 可自动快速鉴别结核和非结核分枝杆菌, 进行初筛性试验。其原理是在含有 C¹¹-棕榈酸为底物的 7H12 培养基内加入选择性抑制剂、NAP(P-Nitro-A-Acetyl-amino- β -Hy-doroxyp Denone) 5 μ g/ml, 经培养后用 Bactec 460 TB 检测, 结核分枝菌群对 NAP 100% 敏感, 非结核分枝杆菌 99.5% 耐药, 可达到快速鉴别的目的。张寅等^[2]用气相色谱与薄层层析技术相结合进行分枝杆菌分类与菌种鉴定, 可将 85% 的标准分枝杆菌分至种的水平。Soolingen^[3]等报道, 用限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP) 分析等。上述方法因所需仪器价格昂贵, 难以普及, 不适应基层单位使用。因此, 建立简便、快速、敏感、特异的病原菌诊断方法, 一直是结核病领域中迫切需要解决的课题。

近年来, 引进的分子生物学技术, 使分枝杆菌的分类菌种鉴定在群体细胞表型的水平上进入分子水平^[4]。目前, 国内外报道的分枝杆菌 DNA 探针有全染色体 DNA、克隆 DNA 片段、人工合成寡核苷酸序列以及 PCR 扩增的 DNA 片断, 国内潘毓萱等^[5]、吴雪琼等^[6]报告用人型结核杆菌、胞内分枝杆菌全染色体 DNA

探针, 可以鉴别结核杆菌和非结核分枝杆菌。全染色体 DNA 探针在实验室对分离菌株分类鉴定上是一种可行的方法。

本文报道应用光敏生物素标记非结核分枝杆菌临床分离株、标准分枝杆菌、标准大肠埃希氏菌全染色体 DNA 制成探针, 与已知标准牛分枝杆菌 (BCG 株) 及不同种的非结核分枝杆菌 DNA 杂交, 用大肠埃希氏菌做阴性对照, 现将实验研究结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株: 14 株非结核分枝杆菌由本所病人痰标本分离所得。16 株标准结核分枝杆菌菌株由北京结核病控制研究所提供。1 株标准大肠埃希氏菌株 (9239), 由中国科学院微生物研究所提供。

1.1.2 试剂: DNA 提取试剂、光敏生物素标记试剂、DNA 变性试剂、显色酶、显色基质、19 孔标准 DNA 杂交板 (每孔中 DNA 含量 0.1—0.25 μ g, 每孔菌种名称见表 1) 等, 日本极东制药工业株式会社研制, 由日本高知县卫生研究所提供。

1.1.3 仪器: 微量移液器, 漩涡振荡器, 离心

机, 300—500W 水银灯, 37℃、55℃ 恒温箱, 分光光度计等。

1.2 方法

1.2.1 分枝杆菌分离培养: 用改良罗氏培养基(L-J) 培养, 每周观察生长情况, 至 8 周。

1.2.2 分枝杆菌传统分类菌种鉴定试验:

将分离培养生长的分枝杆菌菌株, 用试管研磨法制成菌液 (10⁻²mg), 取 0.1ml 分别接种麩吩-2-羟酸胍 (T₂H)、对硝基苯甲酸 (PNB)、5% NaCl 鉴别培养基, 观察其生长速度、菌落颜色, 光照产色试验及暗产色试验等生长情况。生化试验有: 硝酸还原、尿素酶、耐热触酶、吐温-80 水解、芳香硫酸酯酶、菸酸试验等。

1.2.3 DNA-DNA 杂交鉴定方法:

- 用苯酚-氯仿提取试验菌株 DNA
- ↓ 3000r/min 5min
- 取上层部份加乙醇沉淀 DNA
- ↓ 3000r/min 15min
- 加入光敏生物素与 DNA 标记
- ↓ 光照射 15min
- 碱变性使成单链标记 DNA
- ↓
- 用标记 DNA 分别加入 19 孔标准 DNA 杂交反应板
- ↓ 55℃ 杂交 2h
- 洗净液洗涤杂交孔三次, 洗掉未杂交的探针
- ↓
- 加入碱性磷酸酶与生物素化 DNA 结合
- ↓ 37℃ 10min
- 洗净液洗涤杂交孔三次
- ↓
- 加入显色基质液, 使显色
- ↓
- 分光光度计(630nm) 测定吸光度

判定方法: 显色杂交反应板经分光光度计测定吸光度, 最强显色孔吸光度是阴性对照孔吸光度的 1.9 倍以上, 第二强显色孔吸光度的相对类似度在 70% 以下, 30% 以上。

相对类似度

$$= \frac{\text{第二强孔吸光度} - \text{阴性对照孔吸光度}}{\text{最强孔吸光度} - \text{阴性对照孔吸光度}} \times 100$$

2 结果

2.1 分枝杆菌临床菌株的分离鉴定

经分离培养、常规分枝杆菌分类菌种鉴定, 认定临床病人痰液标本中, 非结核分枝杆菌 14 株, 其中瘰疬分枝杆菌 2 株, 综合鸟胞内分枝杆菌 3 株, 偶发分枝杆菌 2 株, 胃分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、土分枝杆菌各 1 株, 戈登分枝杆菌 2 株, 未定型菌株 2 株。

2.2 分枝杆菌光敏生物素 DNA 探针的敏感性与特异性

为了检测光敏生物素 DNA 探针的敏感性与特异性, 用 16 株不同种标准分枝杆菌, 1 株标准大肠埃希氏菌制成光敏生物素探针, 分别与已知标准分枝杆菌 DNA 杂交。结果, 大肠埃希氏菌 DNA 探针与 1 号孔大肠埃希氏菌 DNA 100% 杂交, 与其它 18 孔分枝杆菌 DNA 测定相对类似度均在 30% 以下。人型 H₃₇RV DNA 探针与 2 号孔牛分枝杆菌 (BCG 株) 杂交相对类似度为 98%, 与其它 18 孔杂交相对类似度在 30% 以下。牛分枝杆菌及牛分枝杆菌 (BCG 株) DNA 探针与 2 号孔牛分枝杆菌 (BCG 株) DNA 杂交相对类似度均达 100%。堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌、猿分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、戈登分枝杆菌、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、胃分枝杆菌、蟾分枝杆菌、无色分枝杆菌、土分枝杆菌、次要分枝杆菌和偶发分枝杆菌 DNA 探针与相应孔 DNA 杂交, 相对类似度均在 96—100%, 与不相应孔 DNA 杂交在 30% 以下或 70% 以下(表 1)。

2.3 分枝杆菌临床株与标准株 DNA 杂交相对类似度测定

14 株临床非结核分枝杆菌, 经提取 DNA, 光敏生物素标记, 分别与已制备好的 18 孔标准分枝杆菌 DNA、1 孔阴性对照 DNA 杂交, 相对类似度检测 (表 2) 结果, 2 株瘰疬分枝杆菌

表 1 17 种标准菌株的相对类似度测定结果

已知标准 DNA 杂交孔各孔 名 称	标 准 菌 株																
	大肠埃希氏菌	人型 H ₃₇ R _V	牛分枝杆菌	牛分枝杆菌 BCG 株	堪萨斯分枝杆菌	海分枝杆菌	猿分枝杆菌	瘰癧分枝杆菌	戈登分枝杆菌	鸟分枝杆菌	胞内分枝杆菌	胃分枝杆菌	蟾分枝杆菌	无色分枝杆菌	土分枝杆菌	次要分枝杆菌	偶发分枝杆菌
大肠埃希氏菌(阴性对照) (<i>Escherichia coli</i>)	100																
牛分枝杆菌 (BCG 株) (<i>Mycobacterium bovis</i>)	—	98	100	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
堪萨斯分枝杆菌 (<i>M. kansasii</i>)	—	—	—	—	100	—	—	—	—	55	—	—	—	—	—	—	38
海分枝杆菌 (<i>M. marinum</i>)	—	—	—	—	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
猿分枝杆菌 (<i>M. simiae</i>)	—	—	—	—	—	—	97	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
瘰癧分枝杆菌 (<i>M. scrofulaceum</i>)	—	—	—	—	—	—	—	100	60	—	—	—	—	—	—	—	—
戈登分枝杆菌 (<i>M. goodii</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	60	98	—	—	—	—	—	—	—
斯氏分枝杆菌 (<i>M. szulgai</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
鸟分枝杆菌 (<i>M. avium</i>)	—	—	—	—	54	—	41	46	—	100	50	—	—	—	—	—	—
胞内分枝杆菌 (<i>M. intracellulare</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	60	100	—	—	—	—	—	—
胃分枝杆菌 (<i>M. gastri</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	—	—	—	—	—
蟾分枝杆菌 (<i>M. xenopi</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	—	—	—	—
无色分枝杆菌 (<i>M. nonchromogenicum</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	96	42	—	—
土分枝杆菌 (<i>M. terrae</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	32	98	—
次要分枝杆菌 (<i>M. triviale</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
偶发分枝杆菌 (<i>M. fortuitum</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10
龟分枝杆菌龟亚种 (<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
龟分枝杆菌脓肿亚种 (<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
外来分枝杆菌 (<i>M. fortuitum</i> “ <i>M. peregrinum</i> ”)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	48

注：表中数字为相对类似度；“—”为相对类似度 30% 以下。

I 号株与已知标准瘰癧分枝杆菌 DNA 孔 100% 杂交, 与瘰癧分枝杆菌杂交不完全。3 株 100% 杂交, 其 II 号株与戈登分枝杆菌 DNA 综合鸟胞内分枝杆菌的 I 号株与已知鸟分枝杆

表 2 14 株非结核分枝杆菌临床分离株的相对类似度测定结果

已知标准 DNA 杂交孔 名 称	临 床 分 离 株													
	瘰疬分枝杆菌 I	瘰疬分枝杆菌 II	鸟胞内分枝杆菌 I	鸟胞内分枝杆菌 II	鸟胞内分枝杆菌 III	偶发分枝杆菌 I	偶发分枝杆菌 II	胃分枝杆菌	堪萨斯分枝杆菌	上分枝杆菌	戈登分枝杆菌 I	戈登分枝杆菌 II	未定分枝杆菌 I	未定分枝杆菌 II
大肠埃希氏菌(阴性对照) (<i>Escherichia coli</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
牛分枝杆菌 (BCG 株) (<i>Mycobacterium bovis</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
堪萨斯分枝杆菌 (<i>M. kansasii</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	100	—	—	—	—	—
海分枝杆菌 (<i>M. marinum</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	40	—	—	—	—	—
藜分枝杆菌 (<i>M. simiae</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	38	—	—	—	—	—
瘰疬分枝杆菌 (<i>M. scrofulaceum</i>)	100	60	—	—	—	—	—	—	—	—	65	50	100	—
戈登分枝杆菌 (<i>M. goodii</i>)	50	100	—	—	—	—	—	—	—	—	100	100	60	—
斯氏分枝杆菌 (<i>M. szulgai</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
鸟分枝杆菌 (<i>M. avium</i>)	—	—	100	60	55	—	—	40	—	—	—	—	—	55
胞内分枝杆菌 (<i>M. intracellulare</i>)	—	—	65	100	100	—	—	41	—	—	—	—	—	100
胃分枝杆菌 (<i>M. gastri</i>)	—	—	—	—	—	—	—	100	—	—	—	—	—	—
蝎分枝杆菌 (<i>M. xenopi</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
无色分枝杆菌 (<i>M. nonchromogenicum</i>)	—	—	40	40	40	—	—	—	—	—	—	—	—	41
土分枝杆菌 (<i>M. terrae</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	—	—	—	—
次要分枝杆菌 (<i>M. triplex</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
偶发分枝杆菌 (<i>M. fortuitum</i>)	—	—	—	—	—	96	100	—	—	—	—	—	—	—
龟分枝杆菌龟亚种 (<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>)	—	—	—	—	—	45	40	—	—	—	—	—	—	—
龟分枝杆菌脓肿亚种 (<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>)	—	—	—	—	—	45	45	—	—	—	—	—	—	—
外来分枝杆菌 (<i>M. fortuitum</i> " <i>M. peregrinum</i> ")	—	—	—	—	—	46	45	—	—	—	—	—	—	—

注: 表中数字为相对类似度; “—”为相对类似度 30% 以下

菌 DNA 100% 杂交, II、III 号株与已知胞内分枝杆菌 DNA 100% 杂交。2 株偶发分枝杆

菌 I 号株与已知标准偶发分枝杆菌 DNA 96% 杂交, II 号株 100% 杂交。胃分枝杆菌、堪萨斯

分枝杆菌、土分枝杆菌各1株,戈登分枝杆菌2株,与相应孔已知标准DNA 100%杂交。2株未定型分枝杆菌I号株与已知标准瘰疬分枝杆菌DNA 100%杂交,II号株与已知标准胞内分枝杆菌DNA 100%杂交,与其它孔DNA杂交不完全。

3 讨论

本实验用光敏生物素标记14株非结核分枝杆菌临床分离株、16株标准分枝杆菌及1株标准大肠埃希氏菌DNA制成探针。此法原理是光敏生物素在短暂的可见光照射下,可与菌株核酸连接,制成探针。光敏生物素核酸探针杂交后的检测靠显色反应完成,借助生物素与亲和素碱性磷酸酶结合,形成生物素-亲和素-酶复合物,与底物作用形成紫蓝色,检测可在4—5h完成,显示了快速的特点^[7]。以往DNA探针用放射性同位素标记,经放射性自显影显示结果需要一至数天,但此法缺点是,价格较贵,半衰期短,污染环境,对人体有害等。

分枝杆菌传统的菌种鉴定方法,很难将部分非结核分枝杆菌鉴定到种,如常将鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌鉴定为综合鸟胞内分枝杆菌,而用光敏生物素标记DNA杂交可准确鉴定到种。传统鉴定方法中有些生化试验不是特异的,临床鉴定易出现误差。如临床常规菌种鉴定的瘰疬分枝杆菌II号株经光敏生物素标记DNA杂交鉴定为戈氏分枝杆菌。

用传统鉴定方法鉴定非结核分枝杆菌,有些菌株很难定种,如临床分离2株未定菌株,用光敏生物素标记DNA杂交法鉴定为瘰疬分枝杆菌和胞内分枝杆菌。

17种标准菌株用光敏生物素核酸探针标记,分别与相应的分枝杆菌DNA杂交,其敏感

性为96%,特异性为100%,显示了光敏生物素核酸探针法的敏感性与特异性。

用光敏生物素核酸探针鉴定分枝杆菌,各项实验都很关键,要严格按规程操作,杂交后的反应孔要充分洗涤,把未杂交的DNA探针洗掉,以免残存在孔中出现假阳性。临床中新发现的非结核分枝杆菌菌种不能用此法鉴定。

1993年日本Saito等^[8]报道,结核分枝杆菌复合群、鸟型、胞内、堪萨斯、戈登等分枝杆菌DNA探针试剂盒只与相应分枝杆菌DNA杂交,并对国立疗养院住院病人分离的232株鸟-胞内分枝杆菌,分别用DNA探针鉴定,其敏感性98%,特异性100%,与本文报告相符。

总之,应用光敏生物素标记核酸探针进行DNA·DNA杂交法鉴定分枝杆菌,具有反应速度快、敏感性高、特异性强、使用方便、稳定性好,对人体无害等特点。可为临床提供可靠的诊断和鉴别诊断依据,是分枝杆菌鉴定急待开发的项目,将从分子水平的新领域推动我国分枝杆菌鉴定技术的进步,具有广阔的应用前景。
致谢:承哈尔滨市预防医学研究所徐迪诚主任医师指导及技术协作,特此感谢。

参 考 文 献

- [1] 张立兴. 中国防痨杂志, 1991, 13: 35.
- [2] 张寅, 庄玉辉. 中国防痨杂志, 1995, 17: 69.
- [3] Soolingen DVan. J Clin Microbiol, 1992, 30: 1772.
- [4] 庄玉辉. 中国防痨杂志, 1994, 4: 185.
- [5] 潘毓莹, 王苏民, 田欣欣, 等. 中华结核和呼吸杂志, 1992, 15: 36.
- [6] 吴雪琼, 庄玉辉, 黄蓉蓉, 等. 微生物学报, 1990, 30(3): 234—237.
- [7] 林万明. 临床基因探针诊断实验技术, 上海: 上海科学技术出版社, 1993, 99.
- [8] Saito H. Rapid diagnosis of acid-fast bacilli. Proceeding of the 5th China-Japan international congress of Microbiology. Shanghai Symposium. Chinese Society for Microbiology. 1993, 46—52.

(下转第319页)

THE IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA BY PHOTOBIO TIN MARK NUCLEI ACID PROBES

Tian Runzhi Sun Ruqin Wang Jiufen Wang Yuming Wang Lihua Han Zhen

(Harbin Institute of Prevention and Cure for Tuberculosis, Harbin 150076)

Abstract The DNA probes from separation strain of non-tuberculosis mycobacteria, and panchromosome of standard *mycobacterium* spp. labelled by photo-sensitive biotin were hybridized with DNAs from known standard *mycobacterium bovis* (BCG strain) and various non-tuberculosis mycobacteria to identify mycobacteria strains by negative contrast with *Escherichia coli* into species level rapidly with good specificity and accuracy. The characteristics of this method include short-time consumed identification, ease operation, goods stability and noharm to human, and it is suitable to the identification of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculosis mycobacteria.

Key words *Mycobacterium*, Photobiotin mark nuclei acid probes, DNA•DNA Hyridization, Identification