



## 结核分支杆菌荧光PCR试剂盒的研制及临床试验

PCR已被广泛用于核酸分析、遗传学测试和临床检测,具有灵敏、迅速、准确、方便等特点。但它也有相应的不足,主要表现为:(1)由于采用电泳检测,易引起PCR产物的交叉污染,增加了假阳性结果的可能性;(2)采用的染色剂溴乙锭是强烈致癌物,可能危害操作人员及污染环境。经过研究和改进常规PCR方法,又产生了荧光PCR方法(fluorescence PCR, F-PCR) [1]。本方法由于采用荧光技术和闭管检测,完全克服了上述常规PCR的主要缺点。F-PCR代表了临床基因检测技术的最新发展趋势,具有极高的灵敏性(可检出1个拷贝的目的基因),是一种先进的分子定量检测技术。我们自行设计合成了结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, TB) F-PCR检测试剂盒,测试了297份肺结核病人和249份非结核对照者的痰液标本,并与改良罗氏培养法、金胺荧光染液涂片法、Abbott公司的LCx试剂盒检测进行比较。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 标本来源 标本来自门诊、住院病人和部分健康人群的清晨深部咳出痰液,平行送检。分别作改良罗氏培养法、金胺荧光染液涂片法、Abbott公司的LCx试剂盒检测和F-PCR试剂盒检测。共检测546例患者,其中活动性肺结核标本297例、非结核性标本249例。

1.1.2 标准株 TB灵敏性标准品和非TB特异性标准品均来自中国药品生物制品检定所。TB减毒菌株由上海临检中心提供。

#### 1.2 方法

1.2.1 F-PCR原理 该技术在常规PCR基础上,添加了一条荧光双标记的探针。该荧光探针是标记了两个荧光基团的DNA探针,一个标记在探针的5'端,称为荧光报告基团(R),另一个标记在探针的3'端,称为荧光抑制基团(Q)。两者可构成能量传递结构,即5'端荧光基团所发出的荧光可被另一荧光基团吸收或抑制。探针的3'端羟基已被去除或封闭,不具有延伸能力。探针在无特异性PCR发生时,荧光信号不改变;当有特异性PCR扩增发生时,探针会在PCR过程中被Taq酶的5'→3'活性作用而切断(切口平移效应) [2],抑制作用消失,从而引起报告基团荧光信号的增长。荧光信号伴随着PCR的过程而进行,伴随PCR产物的增长而增长。F-PCR方法就是利用此原理,在PCR反应前后,分别检测特定荧光信号的变化,得到信号增强值,再利用实验确定的信号增强阈值,即可判别样品的阴阳性。

1.2.2 TB F-PCR诊断试剂盒的设计合成 引物和荧光探针位于人型结核杆菌插入序列IS986(EMBL序列MTIS986)。PCR扩增区长349 bp,为多拷贝基因序列。引物序列如下,PTB1: 5'-TCGCCCCGTCTACTTGGTGTT-3'; PTB2: 5'-TGATGTGGTCGTAGTAGGT C-3'。荧光探针序列(FPTB): 5'-ACAACGCCGAATTGCGAAGGGC-3'。上述引物和探针在PE394自动核酸合成仪(美国Perkin Elmer公司)上合成,标记荧光探针,再经Waters 650 HPLC系统(美国Waters公司)纯化。

#### 1.2.3 试剂盒的配制

1.2.3.1 TB-PCR反应液 每份反应液含引物 PTB1、PTB2、FPTB各10 pmol, 5×PCR 反应缓冲液[50 mol/L Tris·HCl(pH 8.0)、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、250 mmol/L KCl、1 mg/ml 明胶) 10 μl, 共45 μl。

1.2.3.2 DNA裂解液 50 mmol/L NaOH、10 mmol/L Tris·HCl(pH 8.0)、1%Triton X-100、1% NP-40、0.5 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

1.2.3.3 阴性质控标准品 采用无菌生理盐水作为阴性对照。

1.2.3.4 阳性质控标准品 TB减毒菌株, 用培养基做斜面培养后, 悬浮于10 ml无菌生理盐水中。用细胞计数板在相差显微镜下进行菌计数。上述TB悬浮菌液用含15%甘油的无菌生理盐水稀释成2 500个菌/μl和25个菌/μl, 分别作为强阳性质控标准品和临界阳性质控标准品, -20 °C保存。

### 1.3 诊断试剂盒的使用方法

1.3.1 标本处理 痰液中加入4倍体积的4% NaOH, 摇匀, 室温下放置30 min左右液化, 取0.5 ml~1.5 ml置于离心管中, 15 000 r/min离心5 min。沉淀加无菌生理盐水1 ml混匀, 15 000 r/min离心5 min, 再重复洗涤1次。沉淀直接加50 μl DNA提取液充分混匀, 沸水浴10 min, 10 000 r/min离心5 min, 取上清液2 μl做PCR反应。

阳性质控标准品和阴性质控标准品的处理: 标准品充分混匀后, 取10 μl加入40 μl DNA提取液中充分混匀, 沸水浴10 min, 10 000 r/min离心5 min, 取上清液2 μl做PCR反应。

1.3.2 PCR反应及荧光检测 取Taq酶一管, 加入PCR反应液45 μl, 处理后样品或质控标准品2 μl, 混匀, 加30 μl石蜡油(如所使用的PCR仪有热盖装置, 可不加), 离心数秒。将该管放入荧光检测仪, 读取并记录读数A<sub>0</sub>。荧光激发波长为487 nm, 检测波长为525 nm。将各反应管放入PCR仪, 按下列条件扩增: 93 °C 预变性2 min, 然后按93 °C 45 s→55 °C 120 s, 共40个循环。待各PCR管充分冷却至室温后, 将扩增后的反应管放入荧光检测仪, 读取并记录读数A<sub>1</sub>。

1.3.3 结果判定 按公式 $A_x = A_1 - A_0$ 计算。将阴性对照管的A<sub>x</sub>称为N, 临界阳性质控管的A<sub>x</sub>称为P<sub>1</sub>, 强阳性质控管的A<sub>x</sub>称为P<sub>2</sub>。若此3值满足 $P_2 > P_1 > 1.3 * N$ , 则本次实验有效; 否则, 实验无效, 应检查试剂、仪器、反应条件等方面的误差。在实验有效的前提下, 样品 $A_x > 1.3 * N$ , 判为阳性, 否则为阴性。

### 1.4 对照方法和诊断标准

1.4.1 对照方法 改良罗氏培养法、金胺荧光染液涂片法按标准方案进行, Abbott公司的LCx检测标本的处理和检测操作按说明书进行。

1.4.2 诊断标准 肺结核的临床诊断采用综合标准, 即根据病史、症状、体征、细菌学检查、X线胸片等辅助检查以及治疗反应效果来确定。选择了符合条件a/b+c/d的297例活动性肺结核标本确定为肺结核阳性标本, 其中a指病人必须现有结核病的典型临床症状和/或典型X线异常改变; b指病人抗结核治疗效果明确; c指涂片或培养法阳性; d指如结核菌培养阴性, 则结素试验必须呈阳性反应。另收集非结核性标本249例, 确定为阴性对照标本。

### 1.5 统计学处理

应用SPSS10.0统计软件, 采用Kappa系数方法进行比较。

## 2 结果

### 2.1 试剂盒实验室性能评价

TB F-PCR的反应产物, 如用于电泳和紫外检测, 与常规PCR无异, 都可见到349 bp的特异性扩增条带。TB F-PCR试剂盒用中国药品生物制品检定所的TB灵敏性标准品测试, 灵敏性可达1个结核杆菌, 表明试剂盒灵敏性良好; TB F-PCR试剂盒用中国药品生物制品检定所的特异性标准品测试, 全部合格, 表明试剂盒特异性良好。

### 2.2 临床试验结果

在546例临床标本中, F-PCR检测阳性率为49.1%(268/546), 显著高于涂片法19.6%(107/546)和培养法20.9%(114/546)(P<0.01); 在灵敏性方面, F-PCR法为89.2%(265/297), 显著高于培养法的38.4%

(114/297)和涂片法的30.0%(89/297)( $P < 0.01$ )；F-PCR法特异性为98.8%，与培养法100%结果无显著差异( $P > 0.05$ )。在114例培养阳性的标本中，F-PCR法检测全部阳性，二者阳性符合率为100%。F-PCR法与LCx法在各项指标上无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

在297例结核标本中，32例F-PCR检测为阴性，培养法与LCx法检测均为阴性，这与病人的排菌情况、痰样本液化的好坏、抑制剂的干扰等因素有关，但也不排除临床误诊的可能性。而在249例非结核标本中，18例涂片阳性，但培养法、F-PCR及LCx法检测为阴性，我们认为是假阳性。F-PCR法检测为阳性的3个病例，LCx法也检测为阳性，培养法、涂片法为阴性，经F-PCR、LCx重复实验仍为阳性，可判定为真阳性，这3例应属于无临床症状的带菌者。

结核杆菌属分枝杆菌属，在临床上除可引起肺结核外，还可引起肾结核、肠结核、结核性脑膜炎和结核性胸膜炎等多种器官病变。结核是一种传染性很强的疾病，潜伏期长，治疗周期也长，因此建立一种确切的结核杆菌病原诊断方法对于结核病的早期确诊、传染源的监测、治疗中的疗效考核及预后观察都有十分重要的意义。肺结核的症状、体征和X线胸片曾经是临床诊断的主要依据，但由于在表现上存在多样性、不典型性，缺乏特异性，很容易出现误诊。结核菌的检定是结核病的直接病原学证据，特异性高，是确定诊断、发现传染源的依据。因此，肺结核病的细菌学检定与结核病的诊断、治疗、预后和控制密切相关。在细菌学的诊断中，涂片法简单省时，但敏感性和特异性均不理想；改良罗氏培养法特异性高，但灵敏性仍很低，只有38.4%，并且耗时长，不利于早期诊断。相比之下，F-PCR技术在结核杆菌检测方面显示出灵敏性高、特异性强、快速及高效等特点，是很有实用价值的检测方法。

F-PCR是进行临床基因诊断的有力手段。从早期的斑点杂交法[4]、bDNA法[5]，到竞争性PCR[6]，PCR-ELISA[7]等，一直存在一个难题，即PCR的假阳性污染度。这些方法都有赖于各种不同类型的PCR后处理过程，使数量巨大的PCR产物容易飞散到空气中，由于PCR的扩增能力惊人，使PCR假阳性污染成为大规模临床应用的重大问题。与这些传统方法不同，新出现的F-PCR方法采用完全闭管检测，不需PCR后处理，它还具有更高的灵敏性和特异性。F-PCR在普通PCR基础上，又增加了一条荧光探针，由专门仪器进行荧光检测，大大提高了灵敏性；同时荧光探针又起到了DNA杂交探针的作用，相当于通过PCR和DNA杂交两步反应加强了特异性。在操作方面，由于采用了荧光检测，PCR产物的电泳和紫外观测步骤都省略了，大大提高了简便性，节约了检测时间。F-PCR还相当安全，整个体系中不包含溴乙啶等有毒、有害物质，对环境的污染很小。本研究采用的荧光检测仪器是国产化的微量荧光检测仪(DA620微量荧光检测仪，上海棱光光学仪器厂)，该仪器适合于在各级医院广泛使用。

致谢：中山大学达安基因诊断中心的高劲松博士和许擎技师在实验过程中提供了很大帮助，在此诚致谢意。

#### 参考文献：

[1] Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization[J]. *PCR Methods Appl*, 1995, 4(6): 357-62.

[2] Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(16): 7276-80.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences[J]. *Biotechnology*, 1992, 10(4): 413-7.

[4] Fagan EA, Guarner P, Perera SD, et al. Quantitation of hepatitis B virus DNA (HBV DNA) in serum using the spot hybridization technique and scintillation counting[J]. *J Virol Methods*, 1985, 12: 251-62.

- [5]Chen CH, Wang JT, Lee CZ, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in human sera by branched-DNA signal amplification [J]. J Virol Methods, 1995, 53(1): 131-7.
- [6]Jalava T, Lehtovaara P, Kallio A, et al. Quantification of hepatitis B virus DNA by competitive amplification and hybridization on microplates[J]. Biotechniques, 1993, 15(1): 134-9.
- [7]Nolte FS, Thurmond C, Fried MW. Preclinical evaluation of AMPLICOR hepatitis C virus test for detection of hepatitis C virus RNA[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(7): 1775-8.

#### 参考文献:

- [1]Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization[J]. PCR Methods Appl, 1995, 4(6): 357-62.
- [2]Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(16): 7276-80.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences[J]. Biotechnology, 1992, 10(4): 413-7.
- [4]Fagan EA, Guarner P, Perera SD, et al. Quantitation of hepatitis B virus DNA (HBV DNA) in serum using the spot hybridization technique and scintillation counting[J]. J Virol Methods, 1985, 12: 251-62.
- [5]Chen CH, Wang JT, Lee CZ, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in human sera by branched-DNA signal amplification [J]. J Virol Methods, 1995, 53(1): 131-7.
- [6]Jalava T, Lehtovaara P, Kallio A, et al. Quantification of hepatitis B virus DNA by competitive amplification and hybridization on microplates[J]. Biotechniques, 1993, 15(1): 134-9.
- [7]Nolte FS, Thurmond C, Fried MW. Preclinical evaluation of AMPLICOR hepatitis C virus test for detection of hepatitis C virus RNA[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(7): 1775-8.