

结核分支杆菌荧光 PCR 试剂盒的研制及临床试验

程 钢袁鞠蕴韶袁新宇袁文国袁 虎渊中山大学达安基因诊断中心袁广东 广州 510089 冤

摘要目的 用荧光 PCR 渊fluorescence PCR 袁F-PCR 冤方法研制结核分支杆菌渊B 冤 DNA 检测试剂盒袁通过临床试验评价其性能袁并与其他方法进行比较遥方法 F-PCR 是 PCR 和荧光探针杂交技术结合所产生的 PCR 方法遥由于采用完全闭管荧光检测袁避免了 PCR 后处理导致的假阳性污染袁又采用了荧光检测技术袁以提高检测的灵敏性遥应用 F-PCR 检测了 297 份肺结核病人和 249 份非结核对照者的痰液标本袁以改良罗氏培养法尧金胺荧光染液涂片法尧bbott 公司的 LCx 试剂盒检测作为对照遥结果 设计合成了 TBF-PCR 诊断试剂盒遥检测阳性率 49.1%袁敏感性 89.2%袁特异性 98.8%袁符合率 93.6%遥结论 F-PCR 在灵敏性上显著优于培养法和涂片法袁与 LCx 试剂盒检测无显著差异遥F-PCR 试剂盒可以检测 TB 的真实感染情况袁对于临床诊断和疗效考察有一定的指导意义遥

关键词 分支杆菌 结核 聚合酶链反应 试剂盒 诊断

中图分类号 院 378.911;R446.9 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588(2002)06-0533-03

Development and clinical trial of fluorescence PCR diagnostic kit to detect Mycobacterium tuberculosis

CHENGGang, HEYun-shao, ZHOUXin-yu, DENGWen-guo, LIHu

Da'an GeneDiagnosticCenter, Sun Yet-sen University, Guangzhou 510089, China

Abstract: Objective To develop a new diagnostic kit for Mycobacterium tuberculosis (TB) detection on the basis of fluorescence PCR (F-PCR) and conduct clinical trial of this kit for assessing its performance in comparison with other diagnostic methods. Methods We collected 546 clinical sputum samples from patients with phthisis and normal subjects to examine TB by way of F-PCR in parallel with examination with modified R. culture, auramine smear with fluorescence staining and LCx DNA diagnostic kit from Abbott for comparison. Results A clinical diagnostic kit for TB detection was developed with F-PCR, and clinical trials showed that its positivity rate was 49.1%, sensitivity 89.2%, specificity 98.8% and efficiency 93.6%. Conclusion F-PCR is obviously superior to culture method and smear method and comparable with LCx in terms of sensitivity, and can be used to monitor TB DNA in the secretion to facilitate clinical diagnose and therapeutic effects monitoring.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; polymerase chain reaction; reagent kits, diagnostic

PCR 已被广泛用于核酸分析尧遗传学测试和临床检测袁具有灵敏尧迅速尧准确尧简便等特点遥但它也有相应的不足袁主要表现为渊渊冤由于采用电泳检测袁引起 PCR 产物的交叉污染袁增加了假阳性结果的可能性渊渊冤采用的染色剂溴乙锭是强烈致癌物袁可能危害操作人员及污染环境遥经过研究和改进常规 PCR 方法袁又产生了荧光 PCR 方法 渊fluorescence PCR 袁F-PCR 冤遥本方法由于采用荧光技术和闭管检测袁完全克服了上述常规 PCR 的主要缺点遥F-PCR 代表了临床基因检测技术的最新发展趋势袁具有极高的灵敏性渊渊冤检出 1 个拷贝的目的基因袁是一种先进的分子定量检测技术遥我们自行设计合成了结核分支杆菌 渊Mycobacterium tuberculosis 袁B 冤-F-PCR 检测试剂盒袁测试了 297 份肺结核病人和 249 份非结核对照者的

痰液标本袁并与改良罗氏培养法尧金胺荧光染液涂片法尧bbott 公司的 LCx 试剂盒检测进行比较遥

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 标本来自门诊尧住院病人和部分健康人群的清晨深部咳出痰液袁并行送检遥分别作改良罗氏培养法尧金胺荧光染液涂片法尧bbott 公司的 LCx 试剂盒检测和 F-PCR 试剂盒检测遥共检测 546 例患者袁其中活动性肺结核标本 297 例尧非结核性标本 249 例遥

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遥TB 减毒菌株由上海临检中心提供遥

1.2 方法

1.2.1 F-PCR 原理 该技术在常规 PCR 基础上袁添加了一条荧光双标记的探针遥该荧光探针是标记了两个荧光基团的 DNA 探针袁一个标记在探针的 5' 端袁称为荧光报告基团渊渊冤另一个标记在探针的 3' 端袁称为

收稿日期 院 002-04-15

基金项目 院 国家野63 冶中试项目 渊国科生字[2000]142 冤 国家高新技术示范工程项目 渊渊 高科[2001]1214 冤

作者简介 院 程 钢 渊970- 冤男袁袁江苏江都人袁现为中山大学博士研究生袁工程师袁电话 院 20-87333640

为荧光抑制基团。两者可构成能量传递结构。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'至3'活性作用而切断。切口平移效应。抑制作用消失。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。Taq-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 TBF-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 的 MBL 序列 MTIS986 的 PCR 扩增区长 349bp 的多拷贝基因序列。引物序列如下：TB1 上游 -TCGCCCGTCTACTTGGTGT-3'；TB2 下游 -TGATGTGGTCGTAGTAGGTC-3'。荧光探针序列：PTB 上游 -ACAACGCCGAATGCGAAGGGC-3'。上述引物和探针在 PE394 自动核酸合成仪（美国 PerkinElmer 公司）上合成。标记荧光探针。再经 Waters650HPLC 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、PTB 各 10pmol。PCR 反应缓冲液 [50mmol/L Tris-HCl、pH8.0、10mmol/L MgCl₂、50mmol/L KCl、1mg/ml 明胶、10 滋、共 45 滋]。

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 10ml 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 2500 个菌/滋和 25 个菌/滋。分别作为强阳性质控标准品和临界阳性质控标准品。20 益保存。

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 30min 左右液化。取 0.5ml~1.5ml 置于离心管中。5000r/min 离心 5 min。沉淀加无菌生理盐水 1ml 混匀。5000r/min 离心 5 min。再重复洗涤 1 次。沉淀直接加 50 滋 DNA 提取液充分混匀。沸水浴 10min。5000r/min 离心 5min。取上清液 2 滋做 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 滋加入 40 滋 DNA 提取液中充分混匀。沸水浴 10min。5000r/min 离心 5min。取上清液 2 滋做 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 滋。处理后样品或质控标准品 2 滋。混匀。加 30 滋石蜡油。所用 PCR 仪有热盖装置。可不加盖。离心数秒。将该管放入荧光检测仪。读取并记录读数 A₀。荧光激发波长为 487nm。检测波长为 525nm。将各反应管放入 PCR 仪。按下列条件扩增：93 益预变性 2min。然后按 93 益 45s、55 益 120s。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 A₁。

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_x 称为 N。临界阳性质控管的 A_x 称为 P1。强阳性质控管的 A_x 称为 P2。若此 3 值满足 $P2 > P1 > 1.3 * N$ 。则本次实验有效。否则实验无效。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。荧光染料涂片法。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、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

TBF-PCR 的反应产物。用于电泳和紫外检测。与常规 PCR 无异。都可见到 349bp 的特异性扩增条带。TBF-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。灵敏度可达 1 个结核杆菌。表明试剂盒灵敏性良好。TBF-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% (65/297), 显著高于培养法的 38.4% (14/297) 和涂片法的 30.0% (9/297) ($P < 0.01$)。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 2 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、痰标本液化的好坏、抑制剂的干扰等因素有关, 也不排除临床误诊的可能性。而在 249 例非结核标本中 8 例涂片阳性, 但培养法、F-PCR 及 LCx 法检测为阴性, 我们认为可能是假阳性。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 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, 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、治疗和预防密切相关。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, 但敏感性仍很低, 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。早期的斑点杂交法、DNA 探针法、竞争性 PCR、CR-ELISA 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, 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, 还具有更高的灵敏性和特异性。F-PCR 在普通 PCR 基础上, 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 (A620 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, 在此诚挚致谢。

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. *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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(16): 7276-80.
- 3 Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *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. *Virology 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. *Virology 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. *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 Clin Microbiol*, 1995, 33(7): 1775-8.