维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)01－0008－03

缺口连接酶链反应检测沙眼衣原体 DNA 的实验研究

韦 红，吴仕孝，杨 军，余加林，伍金林，刘官信

(重庆医科大学儿科学院新生儿科，重庆 400014)

【摘 要】目的：建立缺口连接酶链反应方法检测沙眼衣原体。方法：根据编码 CT 主要外膜蛋白的基因(ompl)的稳定区设计 2 对互补的寡核苷酸探针。采用 G－LCR 和常规 PCR 扩增 CT 标准株 DNA，并对二者检测 CT 的敏感性进行比较。结果：对 5 种 CT 标准株进行 G－LCR 扩增，均出现 54bp 长度的 DNA 片段。敏感性实验可检测出 2 个 CT 原体，而 PCR 可检测出 20EBs。G－LCR 较 PCR 敏感 10 倍；在特异性方面，不扩增肺炎衣原体及其他细菌 DNA，具有很高的特异性。结论：G－LCR 用于检测沙眼衣原体特异、敏感、快速、准确，可为 CT 感染的临床诊断提供依据。

【关键词】沙眼衣原体；连接酶链反应；聚合酶链反应

【中国图书分类法分类号】R374.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－07－01

Detection of Chlamydia trachomatis DNA by gap ligase chain reaction (G－LCR)

WEI Hong, et al

(*Department of Internal Medicine, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To develop a new nucleic amplication method for detection of Chlamydia trachomatis DNA by gap ligase chain reaction(G－LCR). *Methods*: A G－LCR DNA amplification assay that targeted the outer major membrane protein gene(ompl)of CT was established to detect CT infection. The sensitivity and specificity of a newly developed G－LCR test was examined by the use of highly purified elementary bodies (EBs). DNA fragments of different species and from other bacterial were detected with G－LCR and routine polymerase chain reaction (PCR). *Results*: Using G－LCR, DNA fragments of 54bp were amplified from five different species. The sensitivity could be improved to detect out 2 chlamydial elementary bodies. G－LCR detected ten－fold EBs than PCR. No signal was observed when C. pneumoniae and other bacteria were used as templates. *Conclusion*: G－LCR is sensitive, rapid and specific for detection of Chlamydia trachomatis.

【Key words】Chlamydia trachomatis; Ligase chain reaction; Polymerase chain reaction

沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis, CT)是一种常见的性病病原菌，引起男女泌尿生殖道感染，并且可以发生不孕及异位妊娠等严重后遗症。孕妇 CT 感染可异致死胎、胎膜早破、早产、产褥期感染；可传播给新生儿，引起结膜炎及肺炎。CT 的早期诊断对控制传播，预防并发症十分重要。缺口连接酶链反应(gap ligase chain reaction, G－LCR)是继聚合酶链反应(PCR)之后新发展起来的一项具有良好应用前景的检测 CT 的探针扩增技术，在国外已经广泛用于检测 CT 感染。但在我国不可能引进昂贵的全套检测设备，故 G－LCR 的开展受很大限制。本文建立 CT G－LCR 法扩增 CT DNA 并用电泳检测扩增产物取得良好结果，现将结果报道如下。

作者介绍：韦 红(1972－)，女，主治医师，博士，主要研究方向：新生儿学。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30200300)。

1 材料与方法

1.1 实验菌株与试剂

1.1.1 CT 标准株 A/G－17/Bu、B/TW－5、C/TW－3/Cx、E/UW－5/Cx 由儿童医院细胞增养室保存，LGV2(434)株由北京协和医院倪安平博士惠赠。两种肺炎衣原体(Cps)D34 和 B11001 作为阴性对照。临床分离株金黄色葡萄球菌和大肠杆菌做为阴性对照。

1.1.2 试剂 本研究所用的 Tsc DNA 连接酶为罗氏诊断(香港)股份有限公司产品，TaqDNA 聚合酶、dNTP、分子量标准及 NDA 提取试剂盒均购自上海生工生物工程技术服务有限公司，其他试剂均为常规使用的分析纯。

1.2 G－LCR 扩增

1.2.1 模板的制备 使用 DNA 提取试剂盒(生工产品)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

取 200μl 细胞悬液加入细胞裂解液 400μl，混匀后加入蛋白酶 K3μl，混匀后 55℃ 保温 5min。加入 200μl 无水乙醇混匀后转入至"UNIQ－10"柱中，10，000r/min 离心 1min。弃去废液，加入 500μl 洗涤液，离心弃废液，重复洗涤 1 次，最后将柱子离心后，加入洗脱液 100μl 保温 2min，收集离心后溶液，即为所提 DNA。

1.2.2 探针设计 G－LCR 和 PCR 引物选自 MOMP 基因 (ompl)。参照 Dille[2] 设计合成 4 条探针。扩增片段长度为 54p；

Probe1a：5′－TTTTACTTGCAAGACATTCCTCAGG－3′

Probe1b：5′－CTGTTCTACAGGACATCGTTAATTA－3′，

Probe2c：5′－TGAGGAATGTCTTGCAAGTAAAAGC－3′，

Probe2d：5′－CAAGATGTCCTGTAGCAATTAATGG－3′，

1.2.3 G－LCR 扩增 经优化后确定 LCR 的最佳反应条件如下：微量离心管中按顺序加入以下各种成分：三蒸水、10×LCR 缓冲液、4 条探针各 1fmol，dCTP200μM、模板 DNA 及 15uTaqDNA 聚合酶、15UTsc 耐热 DNA 连接酶，反应体积为 50μl。其中 10×LCR 缓冲液由 Roche 厂商配套提供，其成分含有：50mM Tris－HCl，200mM KCl，100mM $MgCl_2$，1% Nonidet P40，5mM NAD，10mM DTT，pH7.5。混匀后石蜡油封液面。LCR 在国产 1169 基因扩增仪(北京新技术研究所)上进行。94℃ 预变性 122s，然后 94℃ 30s 变性，60℃ 180s 连接，共 60 个循环。

1.3 PCR 扩增

选用 Probela 为上游引物，Probe2b 为下游引物。扩增片段长度为 54bp。PCR 反应终体积 50μl。其中中含模板 20μl，上下游引物各 25pmol，1.5mmol/L $MgCl_2$，dNTPs 各 200μmol/L 及 1UTaqDNA 聚合酶，混匀后加入石蜡油 20μl 防蒸发。94℃ 预变性 5min，94℃ 45s 变性，58℃ 45s 退火，72℃ 1min 延伸，共 35 个循环，最后 72℃ 后延伸 10min。

1.4 扩增产物的鉴定

12%聚丙烯酰胺垂直平板电泳。取 LCR、PCR 产物及分子量标准各 5μl 同时点样，200V，25mA 电泳，用溴化乙啶染色，紫外灯下观察摄片。

1.5 特异性试验

CT 标准株 A－G－17、E－UW－5、B－TW－5、C－TW－3 和 LGV_2(434)型分别进行细胞培养后提取其模板 DNA 进行 G－LCR。同时提取 CpsD34 和 B11001 以及临床分离株金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 DNA 进行 G－LCR。

1.6 敏感性试验

提取 CT 标准株 B 型(浓度为 2×10^8/ml EB)提取 DNA 后作系列稀释，取不同浓度稀释度 20μl 作为模板同时进行常规 PCR 和 LCR。

2 结 果

2.1 探针设计的特异性

采用 LCR 的 2 对探针扩增 5 种 CT 标准株 DNA，经电泳在相当 54bp 区内均可见一条 DNA 带。与预测大小吻合。而对 Cps 标准株 D34 和 B11001 的卵黄囊培养物提取 DNA 做为模板，未见阳性带。说明探针与后两种衣原体无交叉反应。对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行扩增，均未见特异性条带。这 2 对探针扩增 CTDNA 具有极强的特异性。见图 1。

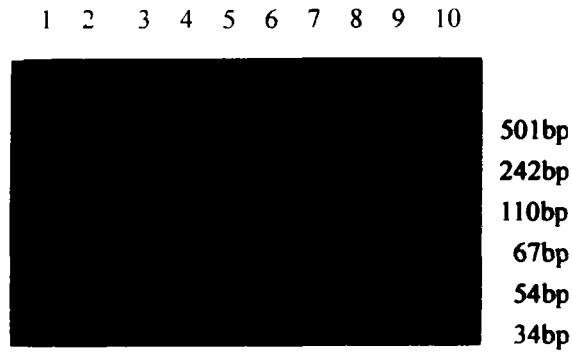


图 1 不同病原体 LCR 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

1：A－G－17；2：B－TW－5；3：C－TW－3；4：E－UW－5；5：LGV2(434)；6：**分子量标准**：pUC19DNA/MspI(HpaⅡ)；7：CpsD34；8：CpsB11001；9：**金黄色葡萄球菌**；lane10：**大肠埃希氏菌**；10：**扩增产物片段长度** 54bp

2.2 G－LCR 的敏感性

纯化原体(EB)的 DNA 做倍比系列稀释，取各稀释度做 LCR，电泳检测，结果稀释至 2 个 EB 的 DNA 经扩增后，在凝胶上仍可见 54bp 阳性扩增带，而 PCR 最多能检测到 20 个 EB。LCR 敏感性比 PCR 高 10 倍。

3 讨 论

CT 感染已经成为世界性的问题，发展敏感、特异、快速的检测方法，对病原体进行检测、鉴定和流行病学调查是沙眼衣原体防治工作的前提。CT 的细胞培养是传统的标准，但其操作费时繁琐，不适合大量标本的检测，且敏感性易受标本质量等因素影

维普资讯 http://www.cqvip.com

响。免疫荧光和酶免疫直接检测法快速简便,但敏感性和特异性均低于培养法;核酸杂交法敏感性较高,却因须放射性标记而不利于推广。PCR 虽已广泛用于 CT 检测,但假阳性率较高。

1991 年,Barany 首次描述用耐热连接酶体外扩增 DNA,并命名为连接酶链反应(ligase chain reaction,LCR)[3]。这种方法应用 4 条寡核苷酸探针(即 2 对互补的引物),当他们在体外结合到靶序列上以后,用耐热的 DNA 连接酶将它们连接起来,两条探针被连接上以后又可以作为新的模板,参与反应,通过变性 - 复性 - 连接等步骤的反复循环使扩增产物呈指数增长。由于使用 2 对引物,较 PCR 灵敏、特异。

G-LCR 是 LCR 的改良模式[4]。本次研究首次在国内建立了 G - LCR 快速诊断 CT 的新方法。采用 2 对探针扩增 5 种 CT 标准株 DNA 后,经电泳在相当 54bp 区内均可见一条 DNA 带。与预测大小吻合。而不扩增两种 Cps 标准株 D34 和 B11001DNA,说明探针与后两种衣原体无交叉反应。对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等临床分离株进行扩增,亦未见特异性条带。提示这 2 对探针扩增 CTDNA 具有极强的特异性。

其他学者的实验证实 LCR 在诊断 CT 上,与细胞培养、直接荧光试验(DFA)及 PCR 相比,具有极高的敏感性和特异性[5~10]。可检测出 2 个原体(EB),且不与肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体及家畜衣原体的 EB 或网状体(RB)起交叉反应。Laffler 等报道 LCR 可检出 10 个分子靶 DNA 的 CT,非常适用于衣原体含量少的标本。[6]。我们首次用 Gap - LCR 检测 CT 标准株,可检测出 2 个 CT EB,而 PCR 只能检出 20 个 EB,敏感性 Gap - LCR 较 PCR 高 10 倍。

一项检测手段是否可行,关键在于它的敏感性和特异性。本试验通过对沙眼衣原体标准株的检测证明其具有敏感、特异的特点,为临床诊断 CT 感染提供了一种先进的分子操作技术手段。然而,电泳法检测 LCR 扩增产物虽然简便、经济,但聚丙烯酰胺凝胶能抑制溴化乙啶的荧光量,在研究中发现,含微量衣原体的标本扩增后电泳可能检测不出来而误判为假阴性,且存在溴化乙啶污染,因此将在 G - LCR 初步研究的基础上,进一步用酶联免疫方法(ELISA)来检测 Gap - LCR 产物,提高其敏感性,使之能在 CT 的临床诊断、流行病学调查方法提供更为可靠的技术保障。

参 考 文 献

[1] Groseclose SL, Zaidi AA, DeLisle SJ, et al. Estimated incidence and prevalence of genital Chlamydia trachomatis infections in the United States, 1996[J]. Sex Transm Dis, 1999; 26(6): 339 - 344.

[2] Dille BJ, Butzen CC, Birkenmeyer LG. Amplification of Chlamydia trachomatis DNA by ligase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1993; 31(3): 729 - 731.

[3] Barany F. The ligase chain reaction in a PCR world[J]. PCR Methods Appl, 1991; 1(1): 5 - 16.

[4] Abravaya K, Carrino JJ, Muldoon S, et al. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap - LCR)[J]. Nucleic Acids Res, 1995; 25; 23(4): 675 - 682.

[5] Miyashita N, Matsumoto A, Niki Y, et al. Evaluation of the sensitivity and specificity of a ligase chain reaction test kit for the detection of Chlamydia trachomatis[J]. J Clin Pathol, 1996; 49(6): 515 - 517.

[6] Laffler TG, Carrino JJ, Marshall RL, The ligase chain reaction in DNA - based diagnosis[J]. Ann Biol Clin (Paris), 1993; 51(9): 821 - 826.

[7] Schachter J. DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: what tests should be used for diagnosis of chlamydia infections[J]? Immunol Invest, 1997; 26(1 - 2): 157 - 161.

[8] Johnson RE, Green TA, Schachter J, et al. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for Chlamydia trachomatis infections in asymptomatic men[J]. J Clin Microbiol, 2000; 38(12): 4382 - 4386.

[9] Waites KB, Smith KR, Crum MA, et al. Detection of Chlamydia trachomatis endocervical infections by ligase chain reaction versus ACCESS Chlamydia antigen assay[J]. J Clin Microbiol, 1999; 37(9): 3072 - 3073.

[10] Doing KM, Curtis K, Long JW, et al. Prospective comparison of the Gen - probe PACE 2 assay and the Abbott ligase chain reaction for the direct detection of Chlamydia trachomatis in a low prevalence population[J]. J Med Microbiol, 1999; 48 (5): 507 - 510.