维普资讯 http://www.cqvip.com

第21卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.4
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1996

连接酶链反应在沙眼衣原体感染诊断中的应用

儿童医院内科教研室 余加林 综述 吴仕孝 审校

中图分类号 R374·1

从1907年Halberstaedter和他的同事们在远征爪蛙研究猴实验性梅毒时发现沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis, Ct)包涵体以来，各国科学家不断对其探索。1957年我国学者汤飞凡和他的同事们建立了鸡胚分离培养Ct的方法，具有划时代意义，从而证明在沙眼、成人和新生婴儿包涵体结膜炎及非淋病球菌尿道炎等疾病中Ct的致病作用。由于鸡胚分离不适宜大量标本分离及流行病学研究，1965年Gordon和Quan建立了细胞培养分离Ct的方法，与随后(1970年)建立的微量免疫荧光法对Ct株免疫分型方法一道，标志研究人体衣原体感染新时代的开始[1]。由于细胞培养条件要求高，需要McCoy或HeLa229或BHK－21(13型)细胞培养48－72小时，然后碘或姬母莎染色显微镜下查找包涵体，或用荧光单克隆抗体染色法检测，不但费时，标本采取困难，且阳性率不高，对生殖道感染至多80%，而对沙眼不到50%[2]；非培养方法有酶联免疫吸附法、免疫荧光分析法等，其结果更不理想，尚有一定程度假阳性。1987年Mullis发明聚合酶链反应(PCR)以来，在微生物检测中得到广泛应用[2,8,9]，需要电泳、限制性内切酶或探针等方法检测扩增产物，但由于所用引物未规范化，标本中抑制物作用及各实验条件不同等原因，所得结果差异较大[8,9,20]。然而，用连接酶来诊断疾病由Landegren等于1988年创立，当时采用T4 DNA连接酶检测人β珠蛋白基因点突变，不扩增模板DNA，称为连接酶介导基因检测技术(Ligase－mediated-gene detection technique)[8]，1989年Wu等首次描述连接扩增反应(ligation amplification reaction, LAR)，仍用T4 DNA连接酶，由于该酶不耐热，每加热扩增循环一周后均需重新添加，操作繁锁，不能自动化进行[2,4]。1991年Barrany等从温泉菌Thermus thermophilus克隆，提取耐热DNA连接酶(Thermostable DNA ligase)，并首次用该酶扩增DNA，正式命名该方法为连接酶链反应(ligase chain reaction, LCR)，该耐热连接酶是依赖NAD^+的连接酶，在重复的94℃1分钟暴露下保持其活性，应用该酶使连接反应接近寡核苷酸融解温度(Tm)，不仅消除了非特异性背景扩增反应，避免每次循环补加酶的麻烦，而且大大地改善了扩增反应的特异性，使LCR得到广泛的应用[6]。到1993年，LCR应用于对Ct的检测[2]，现就这方面的近况作简要综述。

1 原理与方法

LCR是以DNA连接酶将某一寡核苷酸链的5′磷酸与另一相邻寡核苷酸链3′羟基形成磷酸二酯键而连接为基础的，需要两

维普资讯 http://www.cqvip.com

对互补的寡核苷酸探针。在模板DNA、DNA连接酶、寡核苷酸探针存在以及相应反应条件下，首先加热使模板DNA变性分成两条单核苷酸链，然后退火复性，使两对寡核苷酸探针分别与互补的模板单链杂交，如果与模板单链杂交的相邻的寡核苷酸与模板单链安全互补，则耐热连接酶将探针上游段3′端与下游段5′端连接起来，形成更长的寡核苷酸链，再加热变性，连接产物也作为模板再与探针杂交、连接，即变性－复性－连接反复循环，从而使DNA大量扩增[2,6]。在此基础上改良LCR(Gap－LCR)，是用聚合酶及适当的核苷酸填补将被连接两条退火寡核苷酸探针的缺口(gap)，然后再连接、扩增，其优点在特异性方面有聚合酶与连接酶的相加作用。连接处仅发生一个碱基的差异，连接产物就不会形成，故特异性强是其最显著的优点[7]。

2 LCR与PCR

标志着分子生物学革命的PCR已广泛应用并为人们所熟知，与之比较起来，同样为DNA扩增技术的LCR尚处于早期发展阶段；由于其在识别点突变的特异性高于前者，且LCR技术尚在不断完善和改进之中，必将受到越来越多的关注。LCR在反应时间和检测手段上优于PCR，对Ct检测用商品PCR系统Amplico(R)从有症状的男性尿道及尿液标本结果敏感性90％以上，但从女性宫颈标本仅64％；LCR在两性泌尿生殖道标本包括尿道、宫颈拭子、前段尿等的Ct检测上特别敏感，总敏感率90－95％，特异性99.5％或更高[8,12]，动物实验Ct检测敏感率LCR为100％，PCR仅46％[9]。在对影响扩增反应的抑制物方面，Ct阳性宫颈标本抑制物对LCR的抑制范围5－10％，而对PCR则高达30％，上述宫颈拭子标本中许多PCR结果的失败(培养阳性而PCR阴性)是由于抑制物存在造成[8]。因此，LCR是更有效的诊断Ct感染的方法。

3 模板DNA与探针设计

探针设计总原则是提高扩增效率和特异性，采用计算机在核苷酸序列数据库(如欧洲分子生物学实验室即EMBL)中检索分析，Dille等设计的沙眼衣原体模板DNA来源有两方面[2,10－13]：(1)染色体上主要外膜蛋白(MOMP)基因，EMBL登记号J03814，探针所处基因位点36－89和552－595，(2)沙眼衣原体共有7.5Kb质粒探针所处基因位点6693－6739。美国Abbott实验室Lee等一系列有关Ct的LCR文献中均首先用该质粒探针进行质粒DNA扩增以诊断Ct感染[11－13]。模板DNA的拷贝数越多越易于扩增，一个Ct细胞中仅有一个拷贝数的MOMP基因，而7.5kb质粒有7～10个拷贝数之多[10]，故对质粒扩增敏感性更强，这是人们乐于选择质粒作为模板的DNA的原因之一。Schachter等对照MOMP基因LCR和质粒基因LCR的敏感性分别为83％和92％[13]。然而，目前已发现有7.5Kb质粒缺失的Ct分离株[14,15]，故单以质粒模板的LCR存在假阴性可能。Dille等用质粒模板的探针对Ct的15个血清型行LCR，每个反应体系中仅3个原体(EB)亦能扩增到检测水平，而对临床标本中可能出现的其它16种细菌，鹦鹉热衣原体(C.ps)以及肺炎衣原体(C.pn)对照检测，结果全为阴性，说明其特异性强[2]。

4 扩增产物的检测

文献中LCR扩增产物的检测通过三种方式：(1)放射性自显影[2]：将[^{32}P]dCTP或[^{32}P]dGTP(400Ci/mmol)渗入到LCR反应体系中，DNA扩增同时进行放射性标记，扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后放射自显影，观察特异性片段。(2)分光光度测定法：即

维普资讯 http://www.cqvip.com

微粒酶免疫试验(Microparticle enzyme immunoassay)，探针1.2为互补两条寡核苷酸链，其5′，3′端均标记半抗原A，另一对互补的探针3、4的3′、5′端均标记半抗原B，连接反应后扩增长度两端均标有半抗原，抗体(抗半抗原A)包被的微粒与探针1、2结合，未连接的探针3、4被冲洗掉，被连接并扩增的产物末端带有半抗原B，形成检测端，偶合有碱性磷酸酶的抗体(抗半抗原B)与之结合，则碱性磷酸酶催化4-甲基伞形花内酯磷酸(4-methylumbelliferyl Phosphate, 4-MUP，一种荧光酶解物)，生成4-甲基伞形花内酯(4-methylumbelliferone)，在光谱448nm下读数，每48个标本整个过程4～5小时完成。只有LCR扩增产物才有两种半抗原共价地联系在一起，因而产物可检测出信号[12]。(3)Abbott IM^{TM}全自动检测系统:1988年由美国Abbott实验室的科学家们研制及推广应用。利用微粒捕捉酶免疫测定(Microparticle capture enzyme immunoassay, MEIA)原理，采用直径为0.47μm的微粒包被第一抗体作为固定相，使反应面积增加5倍，从而促进反应动力学，减少反应时间，然后被玻璃纤维捕捉，同时使非连接的另一段探针分离，随后加第二抗体及显色，用机器手臂控制每份标本转动检测，计算机自动记录并分析判断及打印结果，一次24份标本30-40分钟内完成[16]。该系统为快速自动化检测LCR产物奠定了技术基础，是LCR广泛应用的重要条件。1994年该系统用于LCR对Ct的大规模检测，同应用在其它微生物检测一样，效果非常满意[11-13,17,18]。

5 应用

1993年以后，美国Abbott实验室及相关单位探索LCR对Ct的检测。Dille等方法学的建立为该工作奠定了基础[2]，1994年Schachter等对美国四个州包括性传播门诊，妇产科门诊及家庭计划门诊的子宫颈标本检测，总Ct阳性率10.9%(234/2132)，LCR敏感率94%，特异性99.9%，而细胞培养敏感性仅65%，故前者远较后者敏感[8,12]。按传统，Ct培养为判断诊断方法的金标准，但培养太慢，而直接荧光检测法(CFA)和酶免疫试验(FIA)可快速诊断，但敏感率仅分别为70.6～76%和18.8-41.2%[17,19,20]。在1994年第八届Ct国际会议上，Schachter总结LCR比DFA、EIA、培养的敏感率提高10%，Patton等和Chernesky等分别比较LCR与PCR，敏感率前者82.3-100%，后者46-70.6%[9,20]。

以前认为尿液不是检测Ct理想的标本，因为病原体含量太少不足以培养出来，然而，当通过扩增DNA技术特别是LCR提高检测敏感性后，尿标本越来越受到重视。尿作为Ct检测标本至少有两个优点:(1)非入侵性检测，避免宫颈或尿道拭子的麻烦和痛苦，易于被大多数的无症状Ct感染者所接受[3,11,12,17,22]，利于大规模检测行流行病学调查;(2)感染的妇女中5-30%只有尿道感染，无宫颈感染，而如果只有宫颈感染，通过分泌物被尿带出，故尿既能反应尿道也能反应宫颈感染[8,11]。Chernesky等对性传播疾病门诊的男性初次排尿标本LCR与尿道拭子细胞培养比较阳性率分别是14%和8.3%，敏感率分别为93.5%和56.5%，与以往尿培养阳性率仅7～9%比较有了很大的提高[12]。Lee等比较妇女初次排尿标本LCR阳性率7.7%，而宫颈拭子培养仅5.4%[11]。由于LCR的推广、普及，原来对Ct诊断的金标准已不适应，故Lee等提出改良或扩大的金标准:(1)培养阳性，(2)培养阴性，但LCR阳性且DFA证实，(3)培养阴性，用MOMP扩增阳性[11]。

美国Abbott实验室已做成LCR商品试

维普资讯 http://www.cqvip.com

剂盒，为临床诊断及研究提供方便[9 11-13 17 20]，据第八届Ct国际学术研究会上获悉，LCR已成为早期诊断Ct泌尿生殖道感染的领先技术，并直接应用于临床。然而、该方法仍有不足之处：大规模Ct流行病学研究所需的自动化检测系统设备昂贵，在第三世界国家及我国应用难以开展；探针需要两对且更长一些；需要两种酶。故成本较PCR更高，但随着科学技术进步，方法学不断改变，LCR必将在Ct的研究及诊断中起到重要作用。

参 考 文 献

1.Oriel JD. In:Orfila J, et al. eds. Chlamydial Infection:Proceedings of the 8th International Symposium on Human Chlamydial Infections. Societa Edifricas Esculapio, Bologna 1994;3

2. Dille BJ, et al. J Clin Microbiol 1993;31:729

3. Landegren U, et al. Science 1988;241:1077

4. Barringer KJ, et al. Gene 1990;89:117

5. Barrany F, et al. Gene 1991;109:1

6. Birkenmeyer LG, et al. J Virol Methods 1991;35:117

7. Abravaya K, et al. Nucleic Acid Res 1995;23:675

8. Schachter J, In:Orfila J, et al. eds. Chlamydial infection:Proceedings of the 8th International Symposium on Human Chamydial Infections Societa Editricas Esclapio, Bologna, 1994:239

9. Patton DL, et al. In:Orfila J, et al. eds. Chlamydial infection:Proceedings of the 8th International Symposium on Human Chlamdial Infections Societa Editricas Esulapio, Bologna 1994:314

10. Palmer L, et al. Plasmids 1986;16:52

11.Lee HH, et al. Lancet 1995;345:213

12.Chernesky MA, et al.JID 1994;170:1308

13.Schachter J, et al. J Clin Microbiol 1994;32:2540

14.Peterson EB, et al. Plasmids 1990;23:144

15. An Q, et al. J Clin Microbiol 1992;30:2814

16. Fiore M, et al. Clim Chem 1988;34:1726

17. Bassiri M, et al. J Clin Microbiol 1995;33:898

18. Birkenmeyer L, et al. J Chin Microbiol 1992;30:3089

19.Marrazz JM, et al. In:Orfila J, et al. eds. Chamydial infecion:Prceedings of the 8th International Symposium on Human Chlamydial Infections, Societa Editricas Esculapio, Bologna 1994:63

20. Chernesky MA et al. In:Orfila J, et al. eds. Chlamydial infection:Proceedings of the 8th Internatonal Symposium on Human Chlamydial infections. Societa Editricas Esculapio, Bologna 1994:326

(收稿日期 1996－02－02)