Gorski的方法也得到相同的结果(结果未给出)。

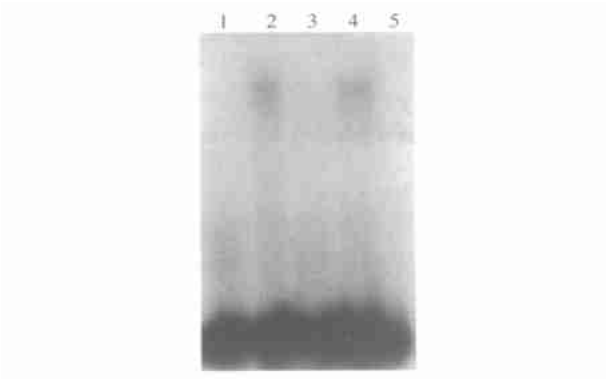


图1 ^{32}P标记的CER与从肝脾组织分离核蛋白抽提物的结合
1:标记探针;2:标记探针加肝组织核蛋白抽提物;3:标记探针加肝组织核蛋白抽提物及50倍体积未标记探针;4:标记探针加脾组织核蛋白抽提物;5:标记探针加脾组织核蛋白抽提物及50倍体积未标记探针

3 讨论

随着后基因组计划时代的到来,真核基因表达调控的研究方法将成为从事分子生物学研究有关实验室的常规方法[5]。核蛋白的分离制备又是基因表达调控研究中常用的技术。一个好的核蛋白抽提物需符合以下两个条件:①含有所有的核蛋白质;②这些蛋白质未被降解,具有转录活性。由于此类蛋白质数量多,浓度不一,因此制备时需:①核纯,无胞浆蛋白污染;核完整,无核蛋白的泻漏;②将所有核蛋白质从DNA解离下来,易于抽提,也无DNA干扰;③操作中注意温度,加蛋白酶抑制剂。传统从组织中分离核蛋白的方法,先将组织匀浆,再通过超速离心分离出细胞核,然后从细胞核中分离核蛋白,但步骤繁琐。通过摸索,我们所建立的从肝脾组织分离核蛋白抽提物的方法,吸收了Dignam和Gorski的两种方法的优点。首先从肝脾实质性器官中分离细胞,再从细胞中快速分离核蛋白抽提物。大大简化了操作步骤,且无需超速离心机等大型仪器设备。所分离获得的核蛋白抽提物具有与顺式作用元件结合的活性,可满足后续实验研究的要求,值得推广。

关键词:组织;核蛋白抽提物;分离
中图法分类号:R394-33 文献标识码:B

参考文献:

[1] Dignam J D, Lebovitz R M, Roeder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase Ⅱ in soluble extract from isolated mammalian nuclei [J]. Nucleic Acids Res, 1983, 11(4): 1 475—1 489.
[2] Gorski M, Somasekhar M D. An enstrogen-responsive element from the 5'-flanking region of the rat prolactin gene functions in MCF-7 but not in Hela cells[J]. Gene, 1988, 69(1): 23—28.
[3] Darbre A. Analytical methods[A]. In: Darbre A. Practical protein chemistry: A handbook[M]. New York: John Wiley and Sons, 1986. 227—335.
[4] Frederick M A, Roger B, Robert E K, *et al*. Short protocol in molecular biology[M]. 3rd ed. Boston: John Wiley and Sons Inc, 1995. 442—447.
[5] 陈 竺,李 伟,俞 曼,等.人类基因组计划的机遇和挑战[J].生命的化学,1999,18(5):5—17.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2001)05-0613-02

技术方法

PCR结合反相膜杂交在淋病诊断中的应用

Detection of *Neisseria gonorrhoeae* with PCR and reverse membrane hybridization

鲁卫平[1],安 琳[2],吴丽娟[1] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所:[1]检验科;[2]泌尿外科;重庆 400042)

提 要:目的 探讨PCR结合反相膜杂交用于临床诊断淋病的可行性。方法 以培养法为金标准,对PCR电泳法和PCR反相膜杂交法进行了比较研究。结果 PCR反相膜杂交特异性高,灵敏度是PCR电泳法的40倍。结论 PCR反相膜杂交技术不仅可以提高PCR特异性、敏感性,且操作简单,无污染,适合临床开展。

淋病奈瑟氏菌是性传播疾病的主要病原菌之一。淋病的临床表现缺乏特异性,诊断主要依靠实验室检查。自PCR技术问世来,由于其灵敏度高,特异性好,快速等特点,在淋病的诊断上得到了广泛的应用[1],但PCR技术还存在一定局限性。考虑到采用PCR结合反相膜杂交技术判断扩增产物,可能会提高淋病诊断的特异性,灵敏度及重复性。为此,本研究对用PCR结合反相膜杂交技术和PCR电泳检测淋菌标本进行了比较,以证实其诊断价值。

作者简介:鲁卫平(1971—),男,河北省唐山市人,硕士研究生,医师,主要从事临床检验诊断方面的研究。电话:(023)68757272
收稿日期:2000-06-23;修回日期:2001-03-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 临床标本

50例来自本院门诊拟诊淋病患者泌尿生殖道标本。15例本院各科住院病人泌尿生殖道感染标本。

1.2 淋菌纯菌DNA

从临床分离的淋病耐瑟氏菌(按临床检验操作规程分离鉴定)中提取。

1.3 试剂和仪器

1.3.1 淋菌选择培养基 T-M培养基(购自英国OXOID公司)。

1.3.2 PCR试剂盒 反相膜杂交试剂盒(中国上海复星实业有限公司)。

1.3.3 DNA扩增仪(美国Bio-RAD公司) 电泳仪(北京六一仪器厂);紫外可见光检测仪(上海顾村电光仪器厂)。

1.4 方法

1.4.1 淋菌培养 按试剂盒说明书操作

1.4.2 PCR及反相膜杂交 按试剂盒说明书操作

1.4.3 灵敏度试验 取淋菌纯菌DNA 100 ng,10倍稀释至10、1 ng及100 pg,再将100 pg倍比稀释为50、25、12.5 pg,分别进行DNA扩增,比较电泳分析和反相膜杂交分析扩增产物的敏感性。

1.4.4 特异性实验 临床分离菌株为淋病奈瑟氏菌,脑膜炎奈瑟氏菌,浅黄色奈瑟氏菌,粘膜奈瑟氏菌,金黄色葡萄球菌,乳酸杆菌,大肠杆菌,类白喉棒状杆菌,草绿色链球菌以及沙眼衣原体,解脲支原体的DNA定量后,用反相膜杂交试剂盒作杂交试验。

2 结果

2.1 特异性实验

经实验,只有淋病奈瑟氏菌的检测结果为阳性,其余菌株检测结果均为阴性。说明该方法特异性高。

2.2 敏感性试验

PCR反相膜杂交法比PCR电泳法敏感40倍,见表1。

表1 **PCR**电泳与**PCR**反相膜杂交敏感性比较

项目	淋菌						
	100 ng	10 ng	1 ng	100 pg	50 pg	25 pg	12.5 pg
PCR电泳	+	+	+	−	−	−	−
PCR反相膜杂交	+	+	+	+	+	+	−

2.3 50例淋病患者标本检测结果

淋病患者标本培养阳性率为72%,PCR电泳为88%,PCR反相膜杂交为96%,见表2。

表2 **50**例淋病患者标本**PCR**电泳,**PCR**杂交与培养比较

	n	PCR电泳		PCR反相膜杂交	
		阳性	阴性	阳性	阴性
培养阳性	36	36(100%)	0	36(100%)	0
培养阴性	14	8(57.1%)	6(42.9%)	12(85.7%)	2(14.3%)
合计	50	44(88.0%)	6(12.0%)	48(96.0%)	2(4.0%)

2.4 15例临床泌尿生殖道感染患者尿道分泌物标本检测结果

PCR电泳阳性病例中,反相膜杂交仅1例阳性,电泳阴性病例中,反相膜杂交发现1例阳性,这两例阳性标本经涂片和培养检测证实为淋病耐瑟氏菌,而另2例电泳阳性而反相膜杂交阴性的标本,经涂片和培养证实为非淋菌感染标本,该结果表明反相膜杂交较电泳更具特异性,见表3。

表3 **15**例泌尿生殖道感染标本**PCR**电泳和**PCR**杂交比较

项目	*n*	PCR反相膜杂交阳性	PCR反相膜杂交阴性
PCR电泳阳性	3	1	2
电泳阴性	12	1	11
合计	15	2	13

3 讨论

本研究通过对PCR电泳和PCR反相膜杂交用于临床检测淋菌相比较研究,从中可看出,反相膜杂交检测扩增产物提高了电泳检测法的敏感性,更重要的是提高了特异性。

PCR可在体外将靶核酸序列扩增上百万倍,但是在实验中PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测法只能判断产物的大小并不能鉴别产物的特异性,造成了传统的PCR检测易产生非特异性产物,出现假阳性和重复性差。另外电泳过程中产生的扩增产物气溶胶会造成实验室污染,凝胶中加入的溴乙锭是一种强致癌物质,对人体非常有害。我们所采用的PCR反相膜杂交技术,是将PCR扩增产物变性后用生物素标记,与固定在纸条上的特异性探针进行反相膜杂交,探针扑获的生物素和标记碱性磷酸酶的链酶亲合素特异性结合后,酶催化底物显色,在纸条上显出蓝紫色斑点。

这样使得特异性得到大大提高,同时SA-AP标记显色系统也使得检测灵敏度得到大大提高,这些特点通过我们的实验结果得到了证实。另外该试剂盒在PCR反应液中采用了UDG/dUTP防污染系统,从而消除了前次扩增产物的影响,检测中不接触EB,因此对人体无害。而且操作简单,无需特殊设备,易于推广。

关键词:聚合酶链式反应;DNA探针;淋病奈瑟氏菌

中图法分类号:R759.204.6 文献标识码:B

参考文献:

[1] 叶元康,陆震宇,吴因茹,等.PCR测定淋病奈瑟氏菌的实验研究和临床应用[J].中华微生物学和免疫学杂志,1996,16(增刊2):36−38.

[2] 尚志强,洪文澜,俞惠民,等.细菌DNA的聚合酶链反应扩增及反相杂交初步分型[J].中华医学检验杂志,1998,21(5):281−284.

[3] Livak K J, Flood S J, 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):357−362.

(编辑 谢义霞)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net