DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.012

cultured endothelial ces of pullmonary artery (PAEC) were observed. It was found that the goat pasma damaged, devitaized or decreased the viabiity of PAEC in a concentration-dependent parttern. The toxic effects of goat plasma was significantly decreased after heating (56℃ for 30 minutes) or precipitation with protamine. Goat pasma exerted diphasic time-dependent effects on PAEC, that is, the activation phase which lasted from the 1st to 3rd hour after the administration of goat pasma and in whihc the viabiity of PAEC was increaeed and the damage phase which extended from the 3rd to 6th hour. These findings suggest that goat pasma during hypoxia compicated hemorrhagic shock may contain certain substances which can activate and damage PAEC and the activation phase of PAEC may pay an important roe in the pathoogica process of hemorrhagic shock.

Key words hypoxia; hemorrhage; shock; lung; endothelial cell

****

呼吸道感染性疾病病原体的基因诊断研究

Use of polymerase chain reaction in the detection of respiratory infections pathogens

黄文杰 郭先健 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆,630037

在本文第一部分,我们建立了三种细菌的PCR检测方法。其反应体积为20 μl,其中引物量为10 pmol/L,模板量为ng水平,4种dNTPs各200 μmol/L,10×PCR缓冲液(含Mg^{H})2 μl,Taq酶0.5 U。反应条件:94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 30 s,最后72℃延伸10 min,35个循环。扩增产物进行Southern转印杂交和直接测序。结果示三种细菌PCR检测的特异性良好,彼此间无交叉反应。检测下限均为fg水平,相当于几个细菌基因组DNA。10例模拟阳性痰标本结果亦均为阳性,扩增产物的特异性还通过Southern杂交和测序得到了证实。

接着又建立了复合PCR方法并对30例临床痰标本进行了检测。在实验中我们采用了摇摆扩增和加入不等量引物的方法,解决了大片段扩增产物量少的问题。结果示复合PCR对三种细菌的检测方法成功。在对30例痰标本的检测中,检出绿脓杆菌13例,流感嗜血杆菌10例,肺炎链球菌7例,其中三种细菌PCR检测均为阳性者3例,二种阳性者5例与绿脓杆菌培养阳性结果相符合者7例,另有2例虽反复多次经PCR检测仍为阴性。复合PCR方法的建立使得一次性从呼吸道标本中检测出常见可疑病原体成为可能,既经济又快速简便。

然后又建立了用微量荧光计测定PCR产物的方法。将三种细菌DNA模板进行倍比稀释,各自单独行PCR扩增。反应体系及反应条件同第一部分,取10 μl扩增后样品进行测定,每一样品测二次,取其平均值为纵坐标,模板浓度为横坐标作图。此法所需样品少(可少至2 μl),对于产量微少的PCR产物,无疑可大大节省样品。操作熟练者,2～3 min便可获得样品中DNA的含量,是一种简单、快速、灵敏准确和重复性好的检测方法,易于在临床实验室推广使用。

由于竞争PCR才是可靠的PCR定量方法,本文通过PCR重组DNA技术构建内参模板后,将之与检测模板一同行PCR,二模板产物采用荧光测定,以其比值为纵坐标,标准模板浓度为横坐标作图。标准曲线建立之后,可据此推算待测模板的量,达到定量的目的。

最后,我们应用RAPD技术对几种呼吸道常见菌和军团菌的几个血清型进行了DNA扩增。反应体系为10 μl,引物加量为5 nmol。反应条件:94℃ 60 s,34℃ 60 s,72℃ 120 s,45个循环。单引物扩增五种细菌基因组DNA的结果示每个样品均可见多条扩增片段,军团菌6种血清型的扩增结果也同样示扩增片段的数量大小不等。

在本实验中,我们将文献报道的方法做了改进,将反应体系变小到仅为10 μl,引物量减少到5 nmol,这样节约了试剂,缩短了反应时间,亦可得到满意的结果。RAPD技术简便易行,省力省时,所需样品也少,仅需ng级DNA,尤其适用于那些生长缓慢、大量培养造价高或有危险的微生物的检测。

关键词 多聚酶链反应;肺炎链球菌;流感嗜血杆菌;绿脓杆菌;基因诊断

中图法分类号 R517.6

(收稿:1995-07-01;修回:1995-07-27)

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