

• 检验技术与方法 •

免疫磁珠捕获联合 PCR-ELISA 定量检测结核分枝杆菌的方法学研究^{*}

王 震¹, 龚玉华², 钱彩娣¹, 孙春红², 周丽萍³, 傅行礼³, 邵启祥³

(1. 镇江市第二人民医院检验科, 江苏镇江 212000; 2. 镇江市第三人民医院检验科, 江苏镇江 212000;
3. 江苏大学医学技术学院, 江苏镇江 212002)

摘要:目的 采用免疫磁珠捕获(IMC)联合双内标 PCR-ELISA(IMC-PCR-ELISA)技术, 建立定量检测结核分枝杆菌的方法。方法 制备能够特异性捕获结核分枝杆菌的免疫磁珠(Dynabeads)。并根据结核分枝杆菌 Mtp40 基因序列以及结核分枝杆菌复合体群 IS6110 序列, 设计 2 对特异性引物(上游引物的 5' 端用生物素修饰), 以及 2 条与 PCR 扩增片段等长的内参照片段(其与扩增模板在引物区的序列相同)和 3 套捕获探针(3' 端用地高辛标记)。先通过免疫磁珠特异性捕获结核分枝杆菌, 再联合双内标 PCR-ELISA 技术检测结核杆菌。结果 采用 IMC-PCR-ELISA 技术定量检测结核分枝杆菌, 全过程约 4 h, 检测限为 5×10^3 copies/mL, 当低内标模板浓度在 30~70 copies/mL, 高内标模板浓度在 8 000~12 000 copies/mL 时, 计算出的浓度与实际加入的目的模板浓度之间有良好的线性关系($r^2=0.998$), 未发现非特异性反应。结论 成功建立了 IMC-PCR-ELISA 定量检测结核分枝杆菌的方法, 此方法具有快速、灵敏、特异、可定量的特点。

关键词: 结核分枝杆菌; 免疫磁珠捕获; 双内标; PCR-ELISA

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 21. 030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)21-2931-03

Methodological study of quantitative detection of Mycobacterium tuberculosis by immunomagnetic capture combined with PCR-ELISA^{*}

Wang Zhen¹, Gong Yuhua², Qian Caidi¹, Sun Chunhong², Zhou Liping³, Fu Xingli³, Shao Qixing³

(1. Department of Clinical Laboratory, Zhenjiang Second People's Hospital, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China;
2. Department of Clinical Laboratory, Zhenjiang Third People's Hospital, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China;
3. Medical Technology College, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China)

Abstract: Objective To establish a quantitative detection method for Mycobacterium tuberculosis by immunomagnetic capture combined with PCR-ELISA detection system with double internal standards(IMC-PCR-ELISA). **Methods** The immunomagnetic (Dynabeads) which could specifically capture Mycobacterium tuberculosis were prepared. According to Mtp40 and IS6110 gene sequence of Mycobacterium Tuberculosis, 2 pairs of primers(upstream primer was modified with Biotin at 5' end), 2 same-length mutant fragments with PCR amplified fragments, and 3 capture probes(modified with digoxigenin at 3' end) were designed. Mycobacterium tuberculosis was captured by immunomagnetic, then detected by PCR-ELISA with double internal standards. **Results** The IMC-PCR-ELISA method could yield quantitative results in about 4 h with a detection limit at 5×10^3 copies/mL. There was a fine linear relationship between the copies of Mtp40(IS6110) in fact and in the calculation through formula when the concentrations of low internal standards were 30—70 copies/mL and the concentrations of high internal standards were 8 000—12 000 copies/mL ($r^2=0.998$). No nonspecific amplification was observed. **Conclusion** A rapid and quantitative method for the detection of Mycobacterium tuberculosis was established successfully. The IMC-PCR-ELISA method was rapid, sensitive, specific and quantitative.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; immunomagnetic capture; double internal standard; PCR-ELISA

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的慢性传染病, 是全球最具威胁的传染病之一。据世界卫生组织(WHO)统计, 我国患结核人数居世界第 2 位, 是全世界 22 个结核病流行严重的国家之一^[1]。当前, 我国在结核病控制方面所面临的问题是结核病的早期诊断, 尤其是痰菌阴性肺结核的诊断^[2]。目前, 临床实验室常用的结核杆菌检测方法有抗酸染色镜检法、细菌培养法及分子生物学检测法等。其中, 痰涂片抗酸染色镜检法方法简单、快速, 但敏感性和特异性差, 每毫升标本中需有 5 000~10 000 个结核分枝杆菌才呈阳性结果^[3]。培养法耗时较长, 且不适合一般实验室开展(P2 级以下实验室不允许做)。近年来, 分子生物学技术检测结核分枝杆菌, 克服了传统方法的诸多不足, 能更快速、敏感、特异的鉴定结核杆菌感染并可用于药物敏感性评价。

本研究建立了免疫磁珠捕获(IMC)与 PCR-酶联免疫吸附试验(PCR-ELISA)技术相结合的定量检测结核分枝杆菌方法(IMC-PCR-ELISA)。首先采用抗结核分枝杆菌抗体包被磁

珠, 捕获标本中的结核分枝杆菌并提取 DNA; 然后在 PCR 反应体系中加入目的模板和另外 2 个已知不同浓度的双内标模板(双内标模板长度与目的模板 PCR 扩增片段等长, 且与目的模板引物区序列相同)。PCR 反应结束后得到 3 类扩增产物, 分别是: 目的模板扩增产物、高内标模板(HS)扩增产物、低内标模板(LS)扩增产物。由于 PCR 上游引物 5' 端用生物素进行了修饰, PCR 生成的 3 类扩增产物的一条链上都带有生物素标记; 进一步用链霉亲和素包被的酶标板捕获 PCR 扩增产物, 变形解链后, 再用 3 套根据 3 类模板设计的捕获探针(3' 端用地高辛标记)与 3 类 PCR 扩增产物分别进行杂交; 再用抗地高辛酶标记抗体与杂交体上的地高辛结合, 漂洗后加底物显色, 测定吸光度值。最后, 根据 3 种模板起始浓度与其最终检测的吸光度(A)值呈正比的关系^[4], 通过公示计算得到目的模板的起始浓度。

1 资料与方法

1.1 标本及菌株来源 结核分枝杆菌标准菌株(H37Ra); 102

* 基金项目: 镇江市社会发展基金资助项目(SH20100019)。 作者简介: 王震, 男, 副主任检验技师, 主要从事临床检验研究。

份临床诊断为肺结核患者的痰标本以及 102 株分离培养菌株均来自于镇江市第三人民医院(镇江市传染病医院)。大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌、草绿色链球菌等阴性对照菌株为本室保存。

1.2 仪器与试剂 752n 紫外分光光度计;德国 Mastercycler Personal 5332 型 PCR 扩增仪;Hettich-UNIVERSAL16R 型低温高速离心机。商品化的链亲和素预包被微孔板为 Nunc 公司产品(货号 236001)。抗结核分枝杆菌抗体为美国 Abcam 公司产品(Rabbit polyclonal to Mycobacterium tuberculosis, ab905)。磁珠为抗 Rabbit-IgG Dynabeads 磁珠(Dynal 公司产

品)。10×PCR buffer(Mg²⁺ Plus)、dNTP Mixture、TaqDNA 聚合酶为日本 Takara 生物技术有限公司产品。引物、模板及杂交探针的设计和合成:从 GenBank 获取人型结核分枝杆菌 Mtp40 基因序列以及结核分枝杆菌复合群 IS6110 序列,设计 2 组 PCR 引物(上游引物的 5'端用生物素修饰);每个 PCR 体系中设计 2 条与 PCR 扩增目的片段等长的内标模板(其与目的模板在引物区的序列相同);根据 PCR 体系中的 3 个模板设计 3 套捕获探针(3'端用地高辛标记)。由宝生物工程(大连)有限公司合成,具体参数见表 1。

表 1 两类基因序列的 PCR 扩增模板、引物及杂交探针参数

基因序列	模板名称	模板序列(5'~3')*	引物(5'~3')	探针(5'~3')
人型结核分枝杆菌 Mtp40 基因序列	Mtp40 (目的模板)	CGG CTG TAC GGC GAA ATG ACA ATG CAG GGA ACG CGA AAA CCC AGA CCG AGC GGA C	T1: Bid-CGG CTG TAC GGC GAA ATG A	探 针 M: CGC GTT CCC TGC ATT-Dig
		CGG CTG TAC GGC GAA ATG AAG CTT GAG CTC CAT CTC AAA CCC AGA CCG AGC GGA C		
		CGG CTG TAC GGC GAA ATG ACT GGT ACG ACA CCT ACG AAA CCC AGA CCG AGC GGA C		
	HS-m		T2:GTC CGC TCG GTC TGG GTT T	探 针 H-m: AGA TGG AGC TCA AGC-Dig
	LS-m			探 针 L-m: GTA GGT GTC GTA CCA-Dig
	IS6110 (目的模板)	GTG CGG ATG GTC GCA GAG ATC CGC GGT CAG CAC GAT TCG GAG TGG GCA GCG ATC AGT GAG	S1: Bid-GTG CGG ATG GTC GCA GAG AT	探 针 S: GAA TCG TGC TGA CCG C-Dig
结核分枝杆菌复合体群 IS6110 基因序列	HS-s	GTG CGG ATG GTC GCA GAG ATC TGT GAC CGC AGA TGC GAC GAG TGG GCA GCG ATC AGT GAG	S2:CTC ACT GAT CGC TGC CCA CTC	探 针 H-s: TCG CAT CTG CGG TCA C-Dig
	LS-s	GTG CGG ATG GTC GCA GAG ATA CCG ATC GGG ACG GGT AGT GAG TGG GCA GCG ATC AGT GAG		探 针 L-s: CTA CCC GTC CCG ATC G-Dig

*:模板序列中斜体部分为引物结合区,双下划线部分为探针结合区。

1.3 方法

1.3.1 痰标本的免疫磁珠分选 (1)免疫磁珠制备:取 0.5 mL 抗 Rabbit IgG Dynabeads 磁珠,经洗涤分离后,加 1 mL 缓冲液混匀,再加入 10 μL 抗结核分枝杆菌抗体(Abcam 公司产品,Rabbit polyclonal-IgG 型),4 ℃孵育 45 min,装入磁场中 2 min,弃去上清液,反复清洗 4 次后,加 0.5 mL 缓冲液混匀后备用。(2)标本处理:痰标本加入等量消化剂,涡旋震荡 30 s,室温静置 15 min,其间摇动数次,使痰液完全液化无痰丝。取液化痰液 1 mL 5 000 r/min 离心 10 min,沉淀加入 pH7.2 的 PBS 缓冲液 0.5 mL 混匀。(3)磁性分离:在处理后的 0.5 mL 痰标本中,加入免疫磁珠 20 μL,置混匀仪上反应 30 min,经清洗后收集磁珠。(4)DNA 模板制备:向磁珠中加入 100 μL ddH₂O 煮沸 10 min,取上清液为模板^[5]。

1.3.2 标准浓度模板配置 将合成的 3 类模板(目的模板、HS、低内标模板)进行定量稀释,再根据相对分子质量计算出每微升模板溶液中的拷贝数。分别稀释成 10~12 000 copies/μL 不同浓度的系列模板备用。

1.3.3 PCR 扩增 在 PCR 反应管中加入 10×PCR buffer(含 Mg²⁺) 5 μL,2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL,上下游引物各 15 pmol,Taq 酶 2 U,再根据需要定量加入不同浓度的 3 种模板,加 ddH₂O 至 50 μL。优化 PCR 反应参数,使其未达到平台期,扩增参数为:预变性 94 ℃ 4 min,变性 94 ℃ 35 s,退火 62 ℃ 35 s,延伸 72 ℃ 40 s,共 20 个循环,72 ℃延伸 3 min。

1.3.4 微孔板杂交-ELISA 定量检测 从反应后的 PCR 管中分别取 10 μL 到 3 孔加有 100 μL 稀释液(0.01 mol/L pH7.2

的 PBS)的链亲和素预包被微孔板中,混匀,45 ℃水浴 40 min,用 37 ℃预温洗液清洗 5 次;加 100 μL 碱性变性液(1.5 mol/L NaCl,0.15 mol/L NaOH),37 ℃水浴 15 min,加 1 mol/L HEPES 35 μL,混匀后,用 37 ℃预温洗液清洗 5 次;加 100 μL 含探针杂交液(探针浓度为 0.05 pmol/μL),45 ℃水浴 40 min,用 37 ℃预温洗液清洗 5 次;加 50 μL 抗 DIG 酶标记抗体,37 ℃孵育 30 min,用洗液清洗 5 次后,加入底物,37 ℃孵育 15 min,加 50 μL 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应,5 min 内采用酶标仪检测 450 nm 下的吸光度值,参考波长为 630 nm。

1.4 统计学处理 采用统计软件 SPSS10.0 进行统计分析。

2 结 果

2.1 双内标 PCR 反应体系中,最佳高、低内标模板浓度确定 将高、低内标模板稀释成不同浓度的系列模板液,进行配对组合试验,以确定 PCR 反应体系中的最佳高、低内标模板浓度:即将低内标模板(LS)稀释成 10、30、50、70 copies/μL 等 4 种浓度的系列模板液,将 HS 稀释成 6000、8 000、10 000、12 000 copies/μL 等 4 种浓度的系列模板液,将各个高、低内标模板液配对成 16 个组合,每个稀释度平行做 3 管。再在每管中加入已知拷贝数的目的模板,经本方法检测后,结果显示当 LS 浓度在 30~70 copies/μL(最佳拷贝数选定为 50 copies/μL),HS 浓度在 8 000~12 000 copies/μL(最佳拷贝数选定为 10 000 copies/μL)时,用公式计算出的目的模板浓度(Y)与实际加入的目的拷贝数之间有良好的线性关系:Y=10^X(r²=0.998),其中 X=lg(LS 浓度)+[lg(HS 浓度)-lg(LS 浓度)]×(目的模板吸光度值-LS 吸光度值)/(HS 吸光度值-

LS 吸光度值)。

2.2 灵敏度 在 PCR 反应体系中,确定 LS 为 50 copies, HS 为 10 000 copies,通过加入不同浓度的系列目的模板液,经检测本试验的最低检测限为 5×10^3 copies/mL。

2.3 特异性 本方法通过特异性免疫磁珠捕获,再经 PCR 扩增和液相分子杂交,大大提高了方法的特异性,其中设计的人型结核分枝杆菌 Mtp40 引物,可特异性检出人型结核分枝杆菌。而设计的 IS6110 引物可特异性检出结核分枝杆菌复合群细菌。对 102 例临床诊断为肺结核患者的痰标本,采用本方法与培养法进行平行测试,结果 102 例均显示为阳性,与培养法结果完全一致。同时,用本方法对其他非结核分枝杆菌菌株进行试验,结果无非特异性反应发生。

3 讨 论

在磁性微粒表面包被抗结核分枝杆菌抗体,可特异性捕获结核分枝杆菌,此法快速简便,对一些培养阴性的标本也能检出^[6]。IMC-PCR-ELISA 法能显著提高目的基因的检出率^[7],其灵敏度要比单独 PCR 方法增加 8~2 000 倍^[8-9]。同时,分子杂交技术的运用,也能大大提高方法的特异性^[10]。此外,双内标 PCR 技术实现了定量检测目的模板液起始浓度的目的。

本研究首先利用免疫磁珠捕获标本中的结核分枝杆菌并提取 DNA,再通过双内标 PCR 反应和液相分子杂交-酶免疫显色技术,建立了定量检测结核分枝杆菌复合群及人型结核分枝杆菌的方法。检测结果显示,该方法具有快速、灵敏、特异、可定量检测的特点,可为临床结核病的诊断和治疗效果监测提供实验依据。

参考文献

[1] 廖丽.我国结核病流行现状及防治工作形势分析[J].中外医疗,

(上接第 2930 页)

浓度显著增加,则提示患者的肾脏出现了蛋白质渗漏的现象^[10]。在糖尿病肾病、高血压、妊娠子痫前期多见尿微量清蛋白的增高,这是肾损伤早期一个十分敏感的指标。尿微量清蛋白正常值的参考值范围为 0.00~1.25 mg/dL。通常在临床上多应用尿微量清蛋白这一指标来对肾病的发生进行监测^[11]。结合患者的发病情况、症状、病史、糖化血红蛋白以及尿微量清蛋白的变化,可以及早发现患者肾微血管病变,进而尽早采取适当的措施。本研究以保存时间和保存温度为双因素进行响应面分析。根据中心组合 Box-Behnken 的实验设计原理,在单因素实验的基础上,对样品保存温度、样品保存时间 2 个影响显著因素采用双因素双水平的响应面分析法优化尿液检验条件,并建立了二次多项回归模型,此模型显著,结果发现尿液以及血液保存在 4℃ 条件下、最好在当天对样品施以检测,否则放置时间过长会增大测量值与稳定状态下期待值的差距。本研究首次报道了利用响应面分析法优化血液以及尿液的检验条件,条件优化之后,使得测量值与稳定状态值十分接近,误差较小,是较为理想的准确测定尿微量清蛋白以及糖化血红蛋白的方法,应用响应面分析法优化后的检验条件可最大限度地减小临床测量误差,从而避免对患者的诊断产生误导,避免出现延误患者治疗的情况。

参考文献

[1] 彭湘杭,杨锐,艾雅琴,等.糖化血红蛋白与空腹血糖诊断糖尿病效果比较[J].广东医学,2011,32(7):863-865.

2014(3):129-130.

- [2] 杨江华,王文杰,何自芳,等.免疫磁珠捕获法分离抗酸杆菌的实验研究[J].中国病原生物学杂志,2011,6(3):168-169.
- [3] 李春林,孙峰.结核分枝杆菌检测方法临床应用的对比研究[J].检验医学与临床,2012,9(17):2164-2166.
- [4] 邱育森,黄义德,张彦定.双内标 PCR-ELISA 定量检测技术的建立[J].第四军医大学学报,2007,28(7):666-668.
- [5] 郑玉群,许卫国,陆伟,等.免疫磁珠分离涂片和 PCR 检测痰内结核分枝杆菌的诊断价值研究[J].江苏预防医学,2010,21(2):14-17.
- [6] Wilson SM, Lane AR, Stanley CJ, et al. Concentration of Mycobacterium tuberculosis from sputum using ligand-coated magnetic beads[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(9): 1164-1168.
- [7] Barletta J, Bartolome A, Constantine NT. Immunomagnetic quantitative immuno-PCR for detection of less than one HIV-1 virion[J]. J Virol Methods, 2009, 157(2): 122-132.
- [8] Thompson DE, Rajal VB, Batz SD, et al. Detection of Salmonella spp. in water using magnetic capture hybridization combined with PCR or real-time PCR[J]. J Water Health, 2006, 4(1): 67-75.
- [9] Hwang YC, Leong OM, Chen W, et al. Comparison of a reporter assay and immunomagnetic separation real-time reverse transcription-PCR for the detection of enteroviruses in seeded environmental water samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(7): 2238-2240.
- [10] 高媛,郑文岭,马文丽,等.基因诊断技术的临床应用进展[J].基础医学与临床,2013,33(1):15-18.

(收稿日期:2014-01-08)

- [2] 王蕾,孔宪涛.系列蛋白测定在早期糖尿病肾病中的应用[J].海医学检验杂志,2000,15(3):133-134.
- [3] 邓洪容,武革,罗国春,等.广东省 1 型糖尿病患者血糖控制现状及相关因素的横断面调查[J].中华医学杂志,2011,91(46):3257-3261.
- [4] 齐为民,朱文芳.单克隆抗体乳胶增强免疫法检测 HbA1c 的评价[J].中国实验诊断学,2009,13(2):215-217.
- [5] 涂国华,姜旭澄,李礼,等.高效液相色谱测定糖化血红蛋白方法的建立与评价[J].江苏大学学报:医学版,2011,21(2):147-150.
- [6] 樊黎,陈敏,吴晓立,等.糖尿病患者糖化血红蛋白浓度与尿微量白蛋白相关性研究[J].中外医学研究,2013,11(32):5-6.
- [7] 瞿良,王惠英,朱玉琨,等.糖尿病血红蛋白检测的循证检验医学观点[J].国外医学:临床生物化学与检验学分册,2005,26(10):718-721.
- [8] 胡应龙,徐明星,雷振山.糖尿病患者糖化血红蛋白及 C 反应蛋白水平与肾脏微血管病变程度的相关性探讨[J].中华医药杂志,2004,4(7):379-379.
- [9] 魏建伟,朱飞,林五弟.糖尿病肾病患者糖化血红蛋白与尿微量白蛋白的变化相关性研究[J].吉林医学,2010,31(24):4057.
- [10] 罗飞宏.糖尿病肾病早期检测标志物研究新进展[J].国外医学:儿科学分册,2003,30(1):7-10.
- [11] 黎桂芳.尿微量白蛋白与糖化血红蛋白检测在糖尿病肾病诊断中的临床意义[J].中外医学研究,2013,11(31):57-58.

(收稿日期:2014-08-20)