

• 论 著 •

DNA 原位杂交法及斑点杂交法检测卡氏肺孢子虫的实验研究*

常志尚,王 冰,吕 锐,张艳丽,赵 蓉

(青岛大学医学院病原生物学实验室,山东青岛 266021)

摘 要:目的 探讨 DNA 原位杂交法及斑点杂交法在卡氏肺孢子虫检测中的应用。方法 设计合成卡氏肺孢子虫特异性寡核苷酸探针,建立卡氏肺孢子虫大鼠动物模型,分别于第 6、8、10 周处死动物,取肺组织提取 DNA 及石蜡切片进行斑点杂交及 DNA 原位杂交,结果同瑞氏-吉氏染色法比较。结果 DNA 原位杂交法和斑点杂交法第 6 周检出阳性结果,检出率均为 (30/30),高于瑞氏-吉氏染色法 (25/30)。结论 DNA 原位杂交法及斑点杂交法是高效准确的卡氏肺孢子虫检测方法。

关键词:卡氏肺孢子虫; 诊断; DNA 原位杂交; 斑点杂交

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)24-3393-03

Experimental study on DNA in situ hybridization and dot blotting for detecting pneumocystis carinii*

CHANG Zhishang, WANG Bing, LV Rui, ZHANG Yanli, ZHAO Rong

(Pathogen Biology Laboratory, Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China)

Abstract: Objective To investigate the application of DNA in situ hybridization and dot blotting for the detection of Pneumocystis carinii. Methods Pneumocystis carinii specific oligonucleotide probe was designed and synthesized. The Pneumocystis carinii rat models were constructed and sacrificed at 6, 8, 10 weeks after constructing model. The lung tissues were taken for making paraffin sections. Then the dot blotting and DNA in situ hybridization were performed. The results were compared parallelly compared with those obtained by the Wright-Giemsa's staining. Results The positive results were detected at 6 weeks. The detection rate was 30/30, which was higher than 25/30 in the Wright-Giemsa's staining. Conclusion DNA in situ hybridization and dot blotting are the efficient and accurate method for the detection of Pneumocystis carinii.

Key words: Pneumocystis carinii; diagnose; DNA in situ hybridization; dot blotting

卡氏肺孢子虫(PC)是一种机会性致病病原体,可在免疫功能低下(如艾滋病患者、晚期肿瘤患者)的人群中诱发卡氏肺孢子虫肺炎(PCP),也是导致该类患者死亡的主要原因^[1-4]。伴随着组织器官移植的增多及恶性肿瘤放、化疗的开展,PCP 的发病率呈上升之势^[5]。PCP 患者体征轻,症状重,病死率高,早期准确、快速诊断尤其重要。而目前对 PC 的诊断主要依赖病原学染色、抗原抗体免疫学检测及聚合酶链反应(PCR)等分子生物学方法,其检测结果易受不同操作人员影响波动较大,而难以被推广应用^[6]。本研究合成特异性寡核苷酸探针,采用 DNA 原位杂交及斑点杂交技术检测 PCP 大鼠模型肺组织中的 PC,并同瑞氏-吉氏染色法比较,探讨 DNA 原位杂交及斑点杂交法在 PCP 实验诊断中的应用,以期为临床诊断提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 SD 雌性大鼠,体质量约 180 g,购自青岛实验动物中心。

1.2 动物模型建立 大鼠随机分组,实验组 30 只,对照组 6 只,分笼饲养,饮水中含 1 mg/mL 四环素预防细菌感染,自由摄取饮食水。实验组大鼠皮下注射地塞米松磷酸钠注射液 1 毫克/次,每周 2 次;对照组不做处理。

1.3 标本获取 于第 6、8、10 周随机抽取实验组大鼠 10 只和对照组 2 只,腹腔注射 25% 水合氯醛 1.5 mL 麻醉,取出肺组织,取 0.2 g 肺组织洗涤匀浆后酚/氯仿法提取核酸;剩余肺组织块用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,6 μm 切片[3-氨基-3-甲氧基硅烷 (APES)处理玻片]。

1.4 原位杂交

1.4.1 主要试剂 蛋白酶 K,焦碳酸二乙酯(DEPC),去离子甲酰胺,鲑鱼精子 DNA,牛血清白蛋白,聚蔗糖-400,硫酸葡聚糖,地高辛加尾标记试剂盒及检测试剂盒均购自 Roche 公司。

1.4.2 探针设计及标记 运用 DNA Star 软件设计出 PC 线粒体核糖体大亚基 rDNA 基因来源的寡核苷酸探针一条,序列为 3'-GGT CTC GCA GAA AAC GAC TTG TTG ATC AG-5',探针由上海生工合成。按照标记试剂盒说明书对探针进行 3'端加尾标记及探针标记效率检测。

1.4.3 DNA 原位杂交检测 切片经脱蜡水化,磷酸缓冲液(PBS)洗 5 min×3 次,缓冲甲酰胺液后固定 25 min, PBS 洗 5 min×3 次,60 μg/mL 蛋白酶 K 在 37℃ 消化 15 min,4℃ 预冷 0.2% 甘氨酸洗 30 s,2×SSC 洗 1 min,预杂交液(50% 去离子甲酰胺,2×SSC,5×Denhardt 液,100 μg/mL 鲑鱼精子 DNA,2% SDS)50 微升/片 37℃ 预杂交 1 h。甩去预杂交液,杂交液(0.1 ng/mL 地高辛标记探针,2×SSC,5×Denhardt 液,50% 去离子甲酰胺,10% 硫酸葡聚糖,2% SDS)25 微升/片 42℃ 杂交 16 h。2×SSC,37℃ 震荡洗片,5 min×3 次。0.5×SSC,震荡洗片,10 min×3 次。Buffer II 室温孵育 25 min,1:1 200 稀释抗 DIG-Ab 37℃ 孵育 70 min,buffer I 洗涤 10 min×3 次,Buffer III 平衡 2 min,NBT/BCIP 显色 1.5 h,水洗,封片。阴性对照为预杂交液代替杂交液、弓形虫滋养体涂片、阴道毛滴虫涂片。阳性对照为卡氏肺孢子虫肺炎的大鼠 BALF 涂片。结果判定:阳性信号为 PC 的胞质呈紫蓝色,阴性对照不显色。

* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2014WS0446)。

作者简介:常志尚,男,实验师,主要从事原虫分子生物学及超微结构研究。

1.5 斑点印记杂交 将提取的大鼠肺组织 DNA 样品溶于 TE, 95 ℃ 水浴 10 min, 冰中速冷 5 min, 使其变性, 分别吸取 2 μL 按顺序加在硝酸纤维素膜上。烤箱 80 ℃ 烘烤 3 h, 烘烤固定 DNA 后, 严格按照试剂盒说明书进行 37 ℃ 预杂交 2 h、42 ℃ 杂交 16 h, 冲洗及显色, 阳性结果为紫蓝色斑点, 观察结果并计算阳性率。

1.6 瑞氏-吉氏染色法 切片经脱蜡水化, 甲醇固定 5 min, 常规瑞氏-吉氏染色, 阳性结果为包囊壁为浅红色, 囊内小体的细胞核染成紫红色、胞质蓝色。

2 结 果

2.1 DNA 原位杂交 实验组大鼠在第 6 周开始检测到虫体, 以包囊为主, 游离分布, 包囊呈椭圆形或圆形, 直径 4~7 μm, 轮廓明显, 包囊壁着色浅, 囊内小体着深紫蓝色, 清晰可辨(图 1), 主要分布在肺泡腔或肺组织内; 8 周时包囊数量增多, 并伴有滋养体出现; 10 周时检测到大量滋养体, 滋养体形态不规则, 大小不均一, 平均大小 1~3 μm, 分布在肺泡腔或肺组织内, 虫体呈紫蓝色(图 2), 在肺脏小血管壁周围也有大量虫体出现。大鼠实验组肺组织切片 PC 阳性标本检出 30 例。

2.2 斑点印迹杂交 应用制备的寡核苷酸探针针对实验组及对照组提取的 DNA 进行斑点杂交, 第 6 周可从实验组大鼠检测到阳性信号, 第 8 周及第 10 周阳性信号逐渐增强, 大鼠实验组肺组织 PC DNA 阳性标本检出 30 例。

2.3 瑞氏-吉氏染色 瑞氏-吉姆萨染色第 6 周开始检出 PC 包囊及滋养体, 其分布及动态变化与原位杂交结果相似, 但其背景着色深, 有非特异性染色的杂质干扰, 镜下辨认困难。肺印片阳性标本检出 25 例。

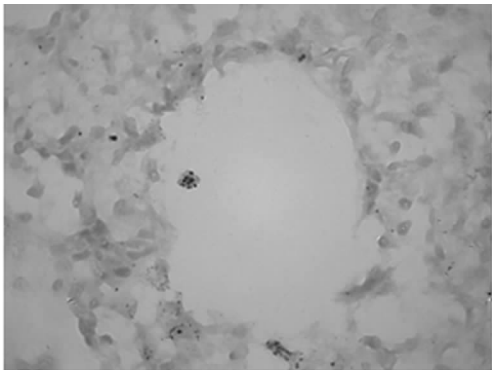


图 1 原位杂交显示第 6 周肺组织内 PC 包囊(×1 000)

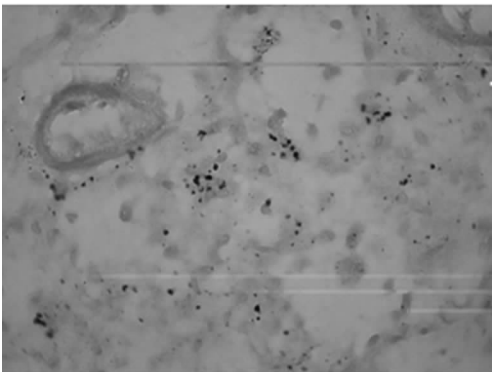


图 2 原位杂交显示第 10 周肺组织内的大量 PC 滋养体(×1 000)

3 讨 论

由 PC 引起的肺部疾病称为 PCP, 在免疫功能低下的宿主

中有较高的发病率^[3]。目前, 国内外学者主要采用糖皮质激素造成大鼠免疫抑制诱发 PCP^[7]。本实验采用 SD 大鼠成功建模, 进一步验证该方法的可行性。

诊断 PC 的可靠方法是病原学检查, 但在实际操作过程中, 其检出率与标本种类、收集方法、染色方法及操作人员经验密切相关, PC 在不同的宿主及生活史阶段, 其包囊和滋养体的比例也发生较大的变化, 早期感染以包囊较多, 晚期滋养体较多^[8-9]。使用 GMS 染色, 只能使包囊着色, 因此漏检较多。瑞氏-吉氏法是常见的染色方法, 滋养体和包囊均能着色, 胞质呈淡蓝色, 胞核呈紫红色, 为 PC 较好的诊断方法, 但该法可使周围背景非特异性着色, 并且滋养体与血小板间识别困难^[10]。

核酸分子杂交技术是一种常用的分子生物学技术, 分为膜上印迹杂交和核酸原位杂交。印迹杂交需提取待测样品 DNA 或 RNA, 将其转移到固相支持膜上, 再与已标记的核酸探针进行杂交的过程。核酸原位杂交是使用特定标记的核酸探针与细胞或组织切片中的核酸进行杂交检测的方法。原位杂交技术不需要提取核酸, 能够在组织细胞中进行单一靶细胞的研究而不受其他成分的影响, 对于含量很低的靶序列也有很高的敏感性, 并可保持组织细胞形态的完整, 便于定位研究, 对于散在于其他组织中的病原体或细胞的研究十分方便。核酸杂交技术已广泛应用于特定基因表达水平的检测, 染色体基因定位及微小病原体检测。寡核苷酸探针属核酸探针的一种, 由 DNA 合成仪合成, 其制备不受酶切位点的影响, 获取方便。寡核苷酸探针为单链 DNA, 不易降解。探针长度短, 穿透性较好。核酸杂交技术用于 PC 检测方面的报道, 多使用随机引物法制备探针, 采用 Northern, Southern 杂交及 PCR 技术^[9, 11]。目前为止, 我国尚少见使用寡核苷酸探针采用 DNA 原位杂交法及斑点印迹法检测 PC 的报道。

本实验以寡核苷酸探针成功采用斑点印迹法检测 PC DNA, 阳性结果为紫蓝色斑点, 无背景噪声, 对比度好, 判别简单, 阳性率为 100%(30/30), 优于瑞氏-吉氏法(25/30)。该方法具有操作简便的优点, 即使没有经过寄生虫专业培训的人员也可掌握; 其缺点是不能观察到虫体的形态及虫体与宿主组织细胞间的相互关系。

实验中 DNA 原位杂交能清晰显示肺组织内 PC 包囊和滋养体的形态, 虫体遍布阳性信号, 呈深紫蓝色, 边缘清楚, 背景不着色, 对于散在的少量虫体也能清晰着色。探针用量仅 0.08 ng/μL 时也能获得可靠结果, 灵敏度高。本实验中, 在感染后第 6 周检测到散在的单个虫体, 表明在有较轻程度感染时, 原位杂交法也能清晰显示, 灵敏度高。阳性率为 100%(30/30), 与斑点印迹法相同, 优于瑞氏-吉氏法。

综上所述, 采用寡核苷酸探针斑点印迹法和 DNA 原位杂交技术检测出感染组织内的虫体, 灵敏度高, 结果判读简单。两种方法可互补使用, 斑点印迹法可侧重于快速定性诊断, DNA 原位杂交法可侧重于虫体形态及虫体与宿主相互作用的研究。

参考文献

[1] Tsai HL, Chang JW, Wu TH, et al. Outcomes of kidney transplant tourism and risk factors for denovo urothelial carcinoma[J]. Transplantation, 2014, 98(1): 79-87.
[2] Fillatre P, Decaux O, Jouneau S, et al. Incidence of Pneumocystis jiroveci Pneumonia among Groups at Risk in HIV-negative Patients[J]. Am J Med, (下转第 3399 页)