

## 应用聚合酶链反应 (PCR) 检测临床 腹泻病标本中志贺氏菌和侵袭性大肠杆菌

任保国 王凤荣 北京市卫生防疫站 (100013)  
任亚茹 北京市和平里医院 (100013)

多年来,细菌性痢疾的检测在临床上使用显微镜直接镜检,误诊率较高。而流行病学细菌检验则沿用古老的细菌培养法,周期长,受服用抗菌素的影响,阳性率低。

志贺氏菌和侵袭性大肠杆菌均携带一条分子量为 120 ~ 140Md 的侵袭质粒。我们利用分子生物学手段,使用一对志贺氏菌和侵袭性大肠杆菌同源序列 ipa H 基因的寡核苷酸引物,以聚合酶链反应 (PCR) 法检测志贺氏菌和侵袭性大肠杆菌所携带的侵袭性质粒 DNA。检测周期仅 4h,准确性远远高于显微镜直接镜检法和细菌培养法。

### 1 材料及方法

#### 1.1 材料

SS 培养基、麦康凯培养基、双糖铁培养基均为英国 oxoid 公司产品,按说明配制。

Taq DNA 聚合酶、d NTP 购自华美生物公司。

引物由军事医学科学院流行病学微生物学研究所提供。

临床大便样本采自本市和平里医院肠道门诊,共 46 件。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 培养方法

大便样品立即接种在 SS 和麦康凯培

养基上,37℃ 培养过夜;第 2 天将可疑菌落转种到双糖铁培养基上,37℃ 培养过夜,对符合菌痢生化反应的做血清学鉴定。

##### 1.2.2 PCR 法

###### 扩增样品的前处理

方法 1 取大便样品黄豆粒大小放置在 1.5mL Eppendorf 离心管中,加入 1mL 灭菌生理盐水,混匀,差速离心,2000r/min 1min,去杂质(沉淀部分),8000r/min 5min,弃上清液,加入裂解液 50μL,充分混匀。

方法 2 样品处理同方法 1,在差速离心后加入含 10μg 蛋白酶 K 裂解液 100μL,55℃ 作用 60min,然后再 95℃ 作用 10min,以终止蛋白酶 K 的作用。

方法 3 大便样品接种在 GN 增菌液中增菌 4h,直接用增菌液扩增。

方法 1 和 2 取 46μL 裂解液处理的样本,方法 3 取 41μL 裂解液(含 1× PCR 缓冲液,0.5%NP-40,0.5%Tween-20),再加入 5μL 增菌样品。3 种处理方法分别再加入 1μL d NTP(各含浓度为 2mMol/L)、引物 1μL(各含 5μmol/L),最后每管加 2 滴灭菌液体石蜡。

###### PCR 反应

将反应离心管置于 DNA Thermal Cycler 仪上,97℃ 10min,于 72℃ 条件下加入 Taq DNA 聚合酶 1U/2μL,然后

进入扩增循环。循环条件为：94℃变性1 min, 60℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共扩增30个循环。最后于72℃保持5 min, 以保证双链完整。

## 2 结果

扩增产物经含有溴化乙锭 (0.5 μg/mL) 的1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 80~100V, 1h。在紫外灯下, 阳性结果为1条DNA带, 经分析其分子长度为498 bp, 与标准DNA对照相符。阴性结果, 没有任何扩增产物。

3种前处理方法的扩增结果完全相同, 但扩增产物较为纯净的是方法2。方法1和方法3处理的样品的扩增产物均有一定杂质, 电泳结果有拖尾现象, 但可以与498bp带识别开。

46件样品结果为, 直接培养法阳性12件, 阳性率为26.09%, 血清型分别为: F<sub>16</sub> 1株, F<sub>2a</sub> 10株, F<sub>5a</sub> 1株。DNA扩增法阳性19件, 阳性率为41.30%。培养法与扩增法符合率为100%, 未出现培养法阳性而扩增法阴性。经统计学分析  $\chi^2 = 5.14, 0.025 > P > 0.010$ , 说明DNA扩增法和细菌培养法有高度显著性差别。

## 3 讨论

用PCR法检测志贺氏菌和侵袭性大肠杆菌国内外有许多报导,〔2,3〕但用临床大便标本直接检测尚未有成功的先例。很多研究者将大便差速离心后再用酚、氯仿

反复抽提, 以减少杂质对扩增系统的影响。纯化DNA。〔1〕但步骤繁杂, 同时在抽提杂质的过程中有很多DNA丢失。本试验初步摸索3种大便样本处理方法, 无需提取质粒DNA, 将菌体直接用于扩增, 方法快, 准确。由于在扩增系统中存在一定的大便杂质, 对Taq DNA聚合酶有一定抑制作用。同时由于杂蛋白的存在, 使电泳结果带有拖尾现象。

随着分子生物学研究的深入, 传统的微生物表型的鉴定, 正在向着最直接、最本质的遗传基因型鉴定的方向发展。本实验说明, 遗传基因的诊断是一种特异性强、敏感度高的方法。至于实验中尚存在的一些不足与缺陷在未来的研究中会得到圆满的解决。

(和平里医院肠道门诊数位大夫与本实验大力合作, 谨表谢意。)

## 4 参考文献

- 1 Jensen J. S, et al. Polymerase Chain Reaction for Detection of Mycoplasma Genitalium in Clinical Samples. J. Clin Microbiol. 1991, 29(1):46~50
- 2 李银太, 等. 1992年用PCR法检测痢疾和侵袭性大肠杆菌. 中华流行病学杂志. 1992, 13(特刊2号): 152~155
- 3 Buysse. J. M. et al. 1987 Molecular Cloning of Invasion Plasmid Antigen (ipa) Gene from Shigella Flexneri: Analysis of Ipa Gene Products and Genetic Mapping. J. Bacteriol. 160: 2561~2569