

【论著摘要】

文章编号:1000-7423(2001)-01-0054-02

聚合酶链反应及 DIG 标记 DNA 探针检测猪囊尾蚴

冯笑梅¹ 修晓芳¹ 王希良² 高杨令² 郭力军² 赵建十¹

中图分类号:R383.34

文献标识码:B

猪带绦虫的幼虫猪囊尾蚴侵入宿主器官组织中寄生,可引起囊尾蚴病(俗称囊虫病),是一种世界性分布危害严重的寄生虫病。内蒙古自治区是囊虫病的高发区之一,近年来人群发病率呈上升趋势。因此,寻找敏感、特异性高的诊断方法以便及早诊断囊虫病的原发性感染甚为重要。目前,该病的诊断多依据临床表现、CT扫描和血清免疫学检测等,但特异性较差。我们根据猪囊尾蚴 27 kDa 蛋白基因保守序列设计了一对特异性引物,建立 PCR 与地高辛(DIG)标记特异性核酸探针相结合,快速、准确检测猪囊尾蚴的方法,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验线 囊尾蚴由新鲜囊虫病病猪肉中获得,脑内囊虫结节取自猪囊尾蚴病患者。

1.2 对照组 细胞核球蚴、健康人白细胞。

1.3 DNA 提取 由病猪肉组织分离出囊尾蚴囊壁内层碎片、头节和囊液。脑囊虫病患者的囊虫结节制成全囊混合物,均用 0.9% NaCl 稀释至 20 ml,加入蛋白酶(20 μg/ml)、1% SDS、0.4 Triton (DNA 分离液)和 0.45% 吐温-20, 60℃ 水浴 3 h,加入酚和氯仿及异戊醇进行常规抽提 DNA,无水乙醇沉淀后真空干燥,适量双蒸水溶解,以 Beckman 紫外分光光度计 260 nm 和 280 nm 测定其 OD 值,梯度稀释后用于 PCR 扩增和斑点杂交。将分离的囊液用 0.9% NaCl 稀释,显微镜下计数头节,然后分装于 EP 管中供聚合酶链反应敏感性试验。对照组参照《分子克隆实验指南》进行制备。

1.4 PCR 引物设计和反应条件 参照 Valdez F 等的报道^[1]设计一对引物,由北京赛北盛生物公司合成并纯化 P1 5'-AATTGGAGGATCCGGGTAC-3', P2 5'-CAAGGTCCACCATAGCAG-3'。PCR 反应条件是在 50 μl 反应体系内加入 50 mmol KCl、10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4)、1.5 mmol/L MgCl₂ 模板 DNA、4 种 dNTP 各 200 μmol/L、引物 P1 P2 各为 500 μmol、Taq DNA 聚合酶。首先于 94℃ 变性 7.0 min,加入 Taq DNA 聚合酶 2 μl,然后 90℃ 60 s 变性、65℃ 45 s 退火、72℃ 60 s 延伸,进行 30 个循环,反应最后 1 个循环于 72℃ 延伸 10 min。

1.5 扩增产物检测 取 10 μl PCR 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳,在紫外透射反应仪上观察结果。

1.6 DNA 斑点杂交 用低熔点琼脂糖凝胶回收 PCR 扩增得到的头节 DNA 片断,用酚、氯仿及异戊醇各抽提 1 次,以 3 mol/L NaCl (pH 5.2) 和无水乙醇沉淀纯化后溶于 20 μl 双蒸水中,按照地高辛标记试剂盒说明书进行标记 DNA 探

针,将提取的样品 DNA 点于 NC 膜上,按照斑点杂交法进行杂交^[2]。

2 结果

2.1 PCR 特异性结果分析 将病猪囊尾蚴的囊壁碎片、头节和囊液,脑囊虫患者囊虫结节、细胞核球蚴和健康人白细胞按上述方法进行提取 DNA 制备,PCR 扩增,结果只有猪囊尾蚴的囊壁碎片、头节、囊液和脑囊虫患者囊虫结节的全囊混合液扩增出单一 704 bp 区带,蛋白分子量 27 kDa,而对照组未出现特异性区带,见图 1 和图 2。

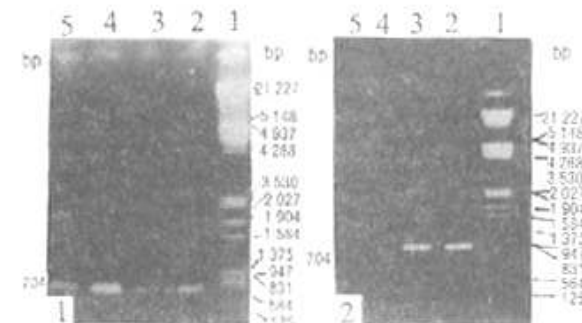


图 1 囊壁碎片、头节、囊液及人脑囊虫结节全囊混合液 PCR 扩增结果 (1) DNA/ Hind III, EcoR I 标志物 (2) 人脑囊虫结节全囊混合液 DNA (3) 囊壁碎片 DNA (4) 头节 DNA (5) 囊液 DNA) 第 2 人脑囊虫结节全囊混合液、猪囊尾蚴囊液及细胞核球蚴囊液 DNAPCR 扩增结果 (1) DNA/ Hind III, EcoR I 标志物 (2) 人脑囊虫结节全囊混合液 DNA (3) 猪囊尾蚴囊液 DNA (4) 细胞核球蚴囊液 DNA (5) 健康人白细胞)

2.2 PCR 扩增产物的敏感性 通过优化的 PCR 反应条件,对囊壁碎片、头节、囊液及人脑囊虫结节全囊混合液的 DNA 均扩增出单一 704 bp 区带。我们将样品稀释后其敏感性仍可达能扩增出 50 μg 水平的 704 bp DNA。细胞核球蚴、健康人白细胞 DNA 虽然增加点样量达 10.0 μg,结果仍为阴性,无交叉反应出现。

2.3 DIG 标记 DNA 探针斑点杂交 将猪囊尾蚴的囊壁碎片、头节、囊液与人脑囊虫结节全囊混合液 DNA 经与非同位素-DIG 标记 DNA 27 kDa 探针进行斑点杂交呈强阳性反应,其敏感性可达 3.0 μg,而细胞核球蚴和健康人白细胞 DNA 未出现杂交反应,见图 3。

2.4 PCR 扩增 PCR 扩增的最佳循环条件和最佳 Mg²⁺ 浓度选择循环次数分别为 20、25、30、35 和 40 次,在其他条件不变的情况下行 PCR 扩增,分别在混合液中各取 10 μl 点于琼脂糖凝胶电泳,结果证实,增加循环次数,并不能增加扩增效果,20 和 25 次产量较低,40 次未出现比 30 和 35 次更强的信号,循环次数的增加反而导致了非特异性扩增。在实验中 Mg²⁺ 浓度分别为 1.0、1.5、3.0、4.5、6.0 和 7.5 mmol/L,当 Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L 时获得较为理想的扩增

基金项目:内蒙古科委 1996 年度攻关项目

作者单位:1 内蒙古自治区医院,呼和浩特 010017;

2 解放军第三军医大学,重庆 630038

效果,当 Mg^{2+} 浓度 $> 4.5 \text{ mmol/L}$ 时,引品扩增片断密度减少,产量降低,出现狭窄的 DNA 片断。

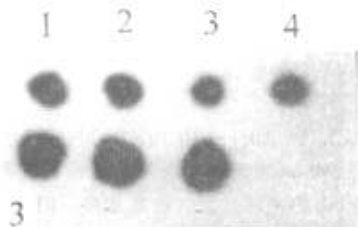


图3 DIG标记DNA探针斑点杂交结果(A行:1和2大猪囊虫头节全囊混合液 DNA 1.0 ng, 3和4猪囊尾蚴囊型碎片 DNA 1.0 ng; B行:1和2头节 DNA 2.0 ng, 3囊液 DNA 2.0 ng, 4行:1和2细胞核纯 DNA 10.0 ng, 3和4健康人白细胞 DNA 10.0 ng)

3 讨论

囊虫病在我国有广泛的地方性流行特征,是一种危害严重的人畜共患寄生虫病。建立有效的基因诊断方法对于该病的预防治疗有重要意义。目前,血和脑脊液中囊虫抗体或特异性循环抗原的检测是囊虫病诊断的重要手段,但是,由于体内免疫记忆细胞的存在,使得囊虫抗体在囊虫死亡后仍持续存在一段时间,其持续时间因人而异,短则数周,长期数年。因此囊虫抗体检测的一个重大缺点是不能判断囊虫是否为活动性感染和作为考核疗效的确切指标^[1]。而囊虫循环抗原的检测也并不优于抗体检测,且阳性率远低于抗体检测的阳性率为低,即存在着更多的假阴性结果^[2]。

PCR技术是近年发展起来的一种体外扩增特异性DNA

技术,具有极高的敏感性和特异性,我们参照国外报道的情况,成功地从囊尾蚴的囊壁碎片、头节、囊液和人脑囊虫DNA标本中获得了特异性27 kDa蛋白基因片段,其敏感性达50 ng或扩增单个头节水平,特别是该引物对微粒棘球蚴和健康人白细胞无交叉反应,表明所选择的引物序列具有高度保守性和扩增的特异性。本实验采用非同位素-DIG标记DNA探针进行核酸斑点杂交,方法简便、安全、检测周期短、成本低廉、特异性强和灵敏度高,能检出3.0 μg的同源DNA,可与同位素标记相媲美,而优于生物素标记核酸探针。配以DIG标记的PCR技术可排除非特异性扩增产物的可能,增强了实验的可靠性和准确性。

本研究建立的PCR和斑点杂交技术应用于猪囊尾蚴的检测方法具有特异、敏感、快速和简便的优点,将对囊虫病的诊断及流行病学调查研究提供一种更有效的手段。该项研究尚可将基因诊断试剂制成PCR试剂盒,方便临床应用,有广阔的推广应用前景。

参 考 文 献

- [1] Valdez F. Immunisation against *Toxocara crassioceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J parasitol*, 1994, 80: 931-936.
- [2] 刘妙良. 地高辛配基标记核酸技术. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19: 34-38.
- [3] 王树军. 传染病学实验室诊断技术. 北京: 科学技术文献出版社, 1998: 127-128.

(收稿日期: 2000-06-23 编辑: 李雅卿)

【简报】

文章编号: 1000-7423(2001)-01-0055-01

阴道毛滴虫标本制作的改良方法

方正明

中图分类号: R382.211

文献标识码: D

按常规染色方法制作阴道毛滴虫染色玻片标本效果尚不理想。王文兰(王文兰. 阴道毛滴虫姬氏染色法的改进. 寄生虫学与寄生虫病杂志, 1985, 3: 3)对阴道毛滴虫姬氏液染色法进行改进。多年来,我们对阴道毛滴虫姬氏液染色玻片标本制作方法进行了摸索,采取涂薄片后用低热度电吹风快速干燥,制作的标本结构清晰,效果稳定。

按陈佩惠(陈佩惠主编: 人体寄生虫学, 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 286-287)的方法制作肝-肺-糖培养基,从医院门诊取回标本接种,36 h后虫体分裂旺盛时涂片制作标本效果最佳。留少许上清液和沉淀物(大量聚集的滴虫)于管底充分混匀后即可涂薄片。用吸管吸取1小滴滴虫悬液于载玻片中央,由中央开始逐步以同心圆形式向外涂布,最后尚未涂完的液体弃去。之后立即用低热度电吹风迅速使其干燥,温度以热风长时间吹手上不烫手为准,再放入盛有甲醇的染色缸中固定10 min,取

出待染色。用pH 6.8-7.0的蒸馏水或磷酸缓冲液按1:15的比例稀释姬氏液原液,滴加在载玻片上置42℃恒温箱中染色40 min,恒温箱顶端排气孔关闭,并在温箱内放置一个盛清水的大培养皿以保持湿度。用自来水冲洗,晾干后,中性树脂封片。以此方法制作滴虫标本,由于采用电热吹风迅速干燥,使虫体保持活动时的形态牢固地粘附在载玻片上。可能是由于较高的温度使虫体处于应激状态释放酶类使得染色后胞质颗粒尤为清晰。教科书上所描述的光镜下其他结构均可见到。但发现涂片的厚薄与虫体形态很有关系。涂片越薄,虫体越显大而圆;涂片越厚,虫体越显收缩变小,且内部着色加深,甚至分辨不出其结构。只有当涂片厚薄适中时,虫体才呈标准的倒梨形且结构清晰。这可能与在厚涂片干燥的过程中引起虫体收缩变形有关。

我们将此标本应用于教学实验课学生观察,效果很好。

(收稿日期: 2000-06-14 编辑: 李雅卿)