

【实验报道】

PCR-ELISA 检测大鼠卡氏肺孢子虫 DNA 的研究

陈盛霞, 姜旭淦, 仇锦波, 徐会娟, 帅连云

【摘要】 目的 建立卡氏肺孢子虫 (*P. c*) DNA 的聚合酶链反应-酶联免疫吸附测定 (PCR-ELISA) 方法, 并探讨其应用价值。方法 实验组患卡氏肺孢子虫肺炎的 SD 大鼠和 Wistar 大鼠各 28 只, 采用 PCR 法扩增大鼠肺组织 DNA 和支气管肺泡灌洗液 (BALF) DNA, 用 PCR-ELISA 检测其扩增产物。28 只患病大鼠分别制作肺组织印片及 BALF 涂片, 姬姆萨 (Giemsa) 染色镜检 100 个视野中有无 *P. c* 包囊 (或滋养体), 与 PCR-ELISA 检测扩增产物结果比较。结果 两种方法检测大鼠肺组织 DNA 阳性率及 BALF DNA 阳性率, 结果相同, 均分别为 96.4% (27/28) 和 100% (28/28)。Giemsa 染色镜检 *P. c* 包囊 (或滋养体), 结果为阳性的大鼠, PCR-ELISA 检测扩增产物结果也均为阳性。阴性对照组, 两种大鼠的肺组织和 BALF 各 10 份标本, 均有 1 只大鼠阳性。结论 PCR-ELISA 检测大鼠卡氏肺孢子虫 DNA, 敏感性较高, 特异性较好, 操作简便, 具有实用价值。

【关键词】 卡氏肺孢子虫; 大鼠; 聚合酶链反应-酶联免疫吸附测定; 脱氧核糖核酸

中图分类号: R382.33

文献标识码: A

Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in Rats by PCR-ELISA

CHEN Sheng-xia, JIANG Xu-gan, QIU Jin-bo, XU Hui-juan, SHUAI Lian-yun

(School of Medical Technology, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

【Abstract】 Objective To establish a PCR-ELISA and evaluate its use in detecting DNA of *Pneumocystis carinii* (*P. c*) in rat model. **Methods** SD rats and Wistar rats were used in the experiment. *P. c* DNA from rat lung tissue and BALF was amplified by PCR. The amplified products were visualized by ethidium bromide (EB) staining after agarose gel electrophoresis or detected by ELISA. The results were compared with that by Giemsa stain. **Results** The positive rate in the two species of rats by the two methods was 96.4% and 100% in lung tissue, 96.4% and 100% in BALF, respectively, with no significant difference ($P > 0.05$). Giemsa positive samples were all positive by PCR-ELISA. The negative control group had one positive by ELISA in lung tissue and BALF respectively. **Conclusion** PCR-ELISA shows a high sensitivity and specificity in detecting the DNA of *Pneumocystis carinii*, which is a secure and easy use method.

【Key words】 *Pneumocystis carinii*; Rat; PCR-ELISA; DNA

Supported by the Natural Science Fund of the Jiangsu Provincial Department of Education (No. 00KJB310009)

卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*, *P. c*) 是机会性致病寄生虫。在发达国家的获得性免疫缺损综合征 (AIDS) 患者中, 因卡氏肺孢子虫肺炎 (PCP) 发病率剧增 (达 60% ~ 80%) 而受到关注。聚合酶链反应 (PCR) 可特异性诊断 PCP。由于琼脂糖凝胶电泳鉴别 PCR 产物的影响因素较多, 用于染色的溴乙锭对人和周围环境有害, 近年来有用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测 PCR 产物代替琼脂糖凝胶电泳分析^[1]。本研究采用 PCR-ELISA 和常规 PCR 检测患卡氏肺孢子虫肺炎的 SD 和 Wistar 大鼠模型, 以期建立一种安全无毒性、操作简便、敏感性和特异性均较好的卡氏肺孢子虫肺炎实验诊断方法。

材料与方 法

1 材料

1.1 标本来源 参照文献 [2] 方法建立大鼠动物模型, 并采集大鼠肺组织和支气管肺泡灌洗液 (BALF), -70 °C 保存备用。

1.2 试剂 链亲和素为美国 Promega 公司产品, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗荧光素抗体购自德国 Roche Diagnostic GmbH 公司, 3', 5'-二甲基联苯胺 (TMB)、平衡酚、缓冲液、脱氧核苷三磷酸 (dNTPs)、Taq DNA 聚合酶均购自上海华美生物工程有限公司, DNA 标志物 DL2000 购自上海 TaKaRa 生物工程有限公司。

1.3 引物 选用按文献 [3] 方法设计的来自线粒体核糖体核糖核酸 (rRNA) 基因的 pAZ102 序列 (由上海博亚生物工程技术公司合成)。引物 I:

pAZI02E-5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3', 其 5' 端用荧光素标记; 引物 II : pAZI02H-5'-GTGTACGTTG-CAAAGTACTC-3', 其 5' 端用生物素标记。

2 方法

2.1 姬姆萨 (Giemsa) 染色 按文献 [2] 方法制作肺组织印片和 BALF 涂片, Giemsa 染色, 油镜观察 100 个视野中 *P. c* 包囊和/或滋养体数。

2.2 *P. c* DNA 提取 实验组 SD 大鼠和 Wistar 大鼠标本各 28 份, 阴性对照组各 10 份。① 肺组织 DNA 提取: 取肺组织 2 mm³, 剪碎, 加 TE 缓冲液 [含 Tris、乙二胺四乙酸 (EDTA)、HCl] 0.5 ml, 在冰浴中匀浆, 之后转移到 1.5 ml 离心管, 加 20% 十二烷基磺酸钠 (SDS) 25 μl、蛋白酶 K (2 mg/ml) 25 μl, 混匀, 60 °C 水浴 1 ~ 3 h。② BALF DNA 提取: 取 BALF 50 μl 于 1.5 ml 离心管中, 加 TE 0.5 ml、20% SDS 25 μl、蛋白酶 K (2 mg/ml) 25 μl, 混匀, 55 °C 水浴 1 ~ 2 h。

以上处理的肺组织及 BALF 经水浴后与等体积的平衡酚充分混合, 2 000 × g 离心 10 min。取上层水相加入等体积酚: 氯仿 (1: 1) 混合液, 混匀, 2 000 × g 离心 10 min。再取上层水相加入等体积氯仿, 轻轻混匀, 2 000 × g 离心 10 min, 取上层水相即为 DNA 模板。

2.3 PCR 扩增 取上述 DNA 模板 1 μl, 分别加入各反应管。反应条件: 50 μl 反应体系中包括 5.0 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTPs、1.0 μmol/L 引物和 3 U Taq DNA 聚合酶。按 93 °C 预变性 3 min、93 °C 变性 60 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环。最后 72 °C 保温 7 min。在 DNA 扩增仪 (ThermoHybaid PCR Express) 上扩增。

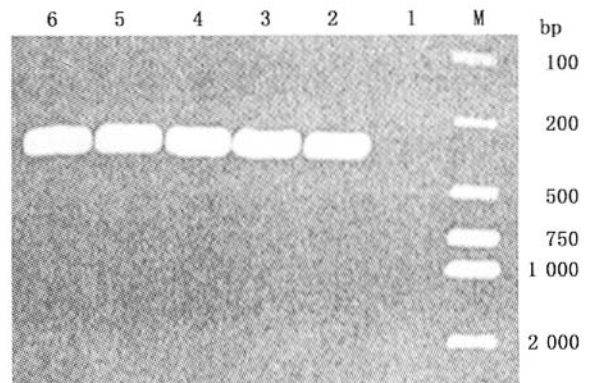
2.4 扩增产物的检测 常规法: PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色, 紫外

灯观察, 与标志物的 *P. c* 特异条带 346 bp 对照。ELISA 法, 参照文献 [4, 5] 方法并作部分改进。1: 50 链亲和素包被聚氯乙烯板 (40 孔) 50 μl/井, 37 °C 2 h 后 4 °C 过夜。第 2 天用洗涤液 [2 × SSC 缓冲液 (含 NaCl、柠檬酸钠、NaOH)] 洗涤 6 次, 每井加 40 μl 5 × SSC 及 10 μl PCR 产物, 37 °C 30 min, 洗板; 加入酶标抗荧光素抗体 (1: 1 000 稀释) 50 μl/井, 37 °C 30 min, 洗板; 加入 TMB 50 μl/井, 37 °C 避光 10 min, 2 mol/L H₂SO₄ 25 μl 终止反应。在 DG3022 酶联免疫检测仪上测吸光度 (*A*₄₅₀ 值)。阴性标本 30 份。*A*₄₅₀ 均值 ≥ $\bar{x} \pm 2s$ 判为阳性。

结 果

1 PCR 检测肺组织和 BALF *P. c* DNA

PCR 检测两种大鼠 *P. c* DNA 结果见图 1 和表 1。



1: 阴性对照, 2: SD 大鼠肺组织阳性对照, 3: SD 大鼠肺组织检测阳性, 4: SD 大鼠 BALF 检测阳性, 5: Wistar 大鼠肺组织检测阳性, 6: Wistar 大鼠 BALF 检测阳性。

1: Negative control 2 Positive control in lung tissue in SD rat, 3: Positive in lung tissue in SD rats, 4: Positive in BALF in SD rats, 5: Positive in lung tissue in Wistar rats, 6: Positive in BALF in Wistar rats.

图 1 PCR 检测大鼠 *P. c* DNA 结果
Fig. 1 Results of *P. c* DNA by PCR

表 1 Giemsa 染色、常规 PCR 与 PCR-ELISA 检测两种大鼠肺组织及 BALF *P. c* DNA 结果
Table 1 Results of Giemsa staining and *P. c* DNA by PCR and PCR-ELISA in lung tissue and BALF in rats

组别 Group	实验组 Experiment				对照组 Control			
	肺组织 Lung tissue		支气管肺泡灌洗液 BALF		肺组织 Lung tissue		支气管肺泡灌洗液 BALF	
	SD 大鼠	Wistar 大鼠	SD 大鼠	Wistar 大鼠	SD 大鼠	Wistar 大鼠	SD 大鼠	Wistar 大鼠
姬姆萨染色 Giemsa staining	89.3% (25/28)	100% (28/28)	60.7% (17/28)	78.6% (22/28)	0	0	0	0
PCR	96.4% (27/28)	100% (28/28)	96.4% (27/28)	100% (28/28)	10.0% (1/10)	0	10.0% (1/10)	0
PCR-ELISA	96.4% (27/28)	100% (28/28)	96.4% (27/28)	100% (28/28)	10.0% (1/10)	10.0% (1/10)	10.0% (1/10)	10.0% (1/10)

SD 大鼠和 Wistar 大鼠的肺组织和 BALF 的 *P. c* DNA 样品均显示出 346 bp 特异性条带,其肺组织及 BALF 的 *P. c* DNA 阳性率,SD 大鼠均为 96.4% (27/28),Wistar 大鼠均为 100% (28/28)。对照组,有 1 只 SD 大鼠肺组织及 BALF 的 *P. c* DNA 均为阳性,其余均为阴性。

2 PCR-ELISA 检测大鼠肺组织和 BALF *P. c* DNA

PCR-ELISA 检测两种大鼠肺组织和 BALF *P. c* DNA,其阳性率与上述 PCR 检测结果完全相同。阴性对照组,两种大鼠各有 1 只其肺组织和 BALF 均为阳性(表 1)。

3 肺组织印片和 BALF 涂片 Giemsa 染色镜检结果

肺组织印片和 BALF 涂片,染色、镜检结果见表 1。实验组 SD 大鼠和 Wistar 大鼠肺组织印片 *P. c* 包囊和/或滋养体的阳性率分别为 89.3% (25/28) 和 100% (28/28);BALF 涂片阳性率分别为 60.7% (17/28) 和 78.6% (22/28)。10 份对照组结果均为阴性。

Giemsa 染色镜检阳性的标本用 PCR 和 PCR-ELISA 检测 *P. c* DNA,结果均为阳性。

讨 论

PCR 检测肺组织和 BALF 中的 *P. c* DNA 阳性率明显高于 Giemsa 病原染色法 *P. c* 虫体的检出率。PCR 技术敏感性较高,可作为 PCP 早期诊断的常规方法^[6]。

常规检测 PCR 产物的方法是一种放射性的方法,而近年来正在被非放射性的方法逐步代替^[7]。溴乙锭是一种强诱变剂,具有中度毒性,操作不慎可对使用者及周围环境产生毒害。本研究检测 PCR 产物的方法为常规 ELISA,所用试剂对环境安全无毒害。

Cartwright 等^[8]报道的 PCR-ELISA (或 PCR-EIA),主要原理是用地高辛 (或生物素或荧光素) 标记引物,其扩增后的产物即标有地高辛 (或生物素或荧光素),该产物被固相板上特异的探针 (用生物素链亲和素交联在板上) 所结合,再加入抗地高辛 (或生物素或荧光素) 酶标抗体-辣根过氧化物酶结合物,最终酶使底物显色。与本法不同之处表现在多 1 个探针杂交过程。本研究实验组 28 份样品,其 PCR-ELISA 结果与 PCR 结果完全相同,与 Cartwright 等^[8]

的报道一致。病原学阳性的大鼠肺组织和 BALF 经 PCR-ELISA 检测,结果均为阳性,表明 PCR-ELISA 方法的阳性符合率较高。*P. c* 是机会性致病寄生虫,正常大鼠存在隐性感染,Weisbroth 等^[9]认为 PCR 可用于检测未经免疫抑制的大鼠肺组织的 *P. c* 隐性感染。本文阴性对照组中两种大鼠均有 1 只 PCR-ELISA 阳性,是否为隐性感染,还需进一步研究证实。

本文采用 PCR-ELISA 技术省略了常规 PCR 检测的琼脂糖凝胶电泳和核酸探针步骤,用于 ELISA 检测判读结果,简化了操作步骤,具有特异性较好、敏感性高,操作简单,安全无毒性等特点。

Cartwright 等^[8]报道的 PCR-ELISA 采用了核酸探针杂交技术,从原理上讲比本法特异性更强,作者认为,只要 PCR 扩增所用引物与 *P. c* 虫体 DNA 模板互补配对,省略核酸探针杂交过程,同样能得到满意结果。常规 PCR 是一种定性方法,无量化指标,无法用于疾病随访和疗效观察。而且用电泳分析鉴定其扩增产物容易产生非特异性条带,检测结果重复性差。PCR-ELISA 法,既可定量分析又可用自动化仪器检测,实现检测过程自动化。这方面有待进一步研究和完善。

参 考 文 献

- [1] 张捷. 定量聚合酶链反应技术及临床实验室应用的价值 [J]. 中国检验医学杂志, 2001, 24: 60-61.
- [2] 陈盛霞, 陈家旭, 徐会娟, 等. 卡氏肺孢子虫肺炎大鼠模型的研究 [J]. 中国人兽共患病志, 2002, 18(1): 79-81.
- [3] Wakefield AE, Pixey FJ, Banerji S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification [J]. Lancet, 1990, 336: 451-454.
- [4] 张龙兴, 汤林华, 冯晓平, 等. PCR-ELISA 检测疟原虫 DNA 的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16: 11-15.
- [5] 陈盛霞, 周慧娟, 帅连云, 等. 两种快速 ELISA 用于检测囊虫病患者特异性抗体的实验观察 [J]. 镇江医学院学报, 1997, 7: 285-287.
- [6] 陈盛霞, 姜旭淦, 徐会娟, 等. PCR 检测大鼠卡氏肺孢子虫的研究 [J]. 中国人兽共患病志, 2004, 20(10): 891-893.
- [7] 张悛, 姜洪杰, 郭增柱. 卡氏肺孢子虫分子生物学研究进展 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15: 45-50.
- [8] Cartwright CP, Nelson NA, Gill VJ. Development and evaluation of a rapid and simple procedure for detection of *Pneumocystis carinii* by PCR [J]. J Clin Microbiol, 1994, 32: 1634-1638.
- [9] Weisbroth SH, Geistfeld J, Weisbroth SP, et al. Latent *Pneumocystis carinii* infection in commercial rat colonies: comparison of inductive immunosuppressants plus histopathology, PCR, and serology as detection methods [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 1441-1446.

(收稿日期: 2004-03-16 编辑: 富秀兰)