

聚合酶链反应检测日本血吸虫5D 基因的实验研究

陈一平 翁心华 徐肇玥 沈雪芳 岑屹

上海医科大学华山医院传染病教研室 上海 200040

提要 目的: 寻找一种有效的日本血吸虫病诊断及疗效考核方法。方法: 以血吸虫的成虫、虫卵、尾蚴DNA 为模板, 利用聚合酶链反应(PCR) 对日本血吸虫编码免疫原性毛蚴抗原的5D 基因进行扩增, 检测其敏感性与特异性。结果: 用 PCR 检测日本血吸虫的成虫、虫卵、尾蚴DNA, 均出现明显特异性条带。通过引物1、引物2单扩增, 即能检测到单个虫卵、单个尾蚴或针尖大小的成虫组织。采用Nest-PCR 和非同位素探针能将敏感性进一步提高。常见的肠道细菌及人基因组DNA 无交叉阳性出现。结论: PCR 方法检测日本血吸虫基因的敏感性与特异性均满意。

关键词 聚合酶链反应 日本血吸虫 5D 基因

日本血吸虫病是我国一个重要传染病, 其确诊除病原学外主要依赖于免疫学诊断。然而迄今已建立的检测系统, 其敏感性与特异性均不够理想, 对于慢性及晚期血吸虫病病人的检测效果尤差。聚合酶链反应(PCR) 现已应用于许多病原体的检测, 其敏感性与特异性均较理想^[1-3], 但用于日本血吸虫的检测尚未见报道。作者就这一方面进行了一些探索。

材料与方 法

1 日本血吸虫标准株

日本血吸虫(中国大陆株)成虫(雌雄各半)、尾蚴由上海市血吸虫病防治研究所惠赠, 虫卵由本实验室从感染兔之肝脏中进行提取。对照所用的常见肠道细菌DNA 如大肠杆菌、粪肠球菌、伤寒杆菌、奇异变形杆菌以及人基因组DNA 为本实验室用标准菌株所纯化。

2 DNA 抽提

日本血吸虫成虫80条用玻璃匀浆器匀浆, 生理盐水稀释至2 ml, 加蛋白酶K(终浓度200 μg/ml), SDS(终浓度1%), Triton X-100(终浓度0.4%), Tween-20(终浓度0.45%), 60 水浴3 h, 加SS-酚, 氯仿, 异戊醇进行DNA 抽提, 无水乙醇沉淀, 真空干燥, 适量TE 缓冲液溶解, 紫外分光光度计测

OD 值, 梯度稀释后用于PCR 扩增。

虫卵及尾蚴分别用生理盐水稀释, 显微镜下计数, 分装于盛有适量生理盐水的Eppendorf 管中, 供PCR 敏感性试验用, 标本经5 000 rpm 离心5 min, 弃去上清后加入裂解液100 μl(Tris HCl 10 mmol, PH 7.4, Triton X-100 0.4%, NP-40 0.4%, 蛋白酶K 300 μg/ml), 60 水浴2 h, 100 煮沸10 min, 离心, 10 000 rpm, 5 min, 取上清10 μl 做为模板DNA 用于PCR 扩增。

3 PCR 引物及探针的合成

PCR 引物及探针参照日本血吸虫5D 基因DNA 序列设计, 其核苷酸序列如下: 引物1: 5' TCA CAC ATT CAC ACA CAG TAC 3'; 引物2: 5' AAG TAC CAC CAC CAT AAT GTC 3'; 引物3: 5' TTC CTA CTA TTA TTT ACT AGC 3'; 引物4: 5' TGA TCC ATG TGG ATC GCC GAC 3'; 探针: 5' CCA GTC ATC TCA ACA GGT CAG CAT ATT GAT 3'。引物及探针由中国科学院上海细胞生物研究所合成, 外引物扩增的PCR 产物大小为262 bp, 内引物扩增的PCR 产物大小为165 bp。

4 PCR 扩增

扩增反应在上海复旦生物技术研究所生产的F-800 DNA 扩增仪上进行。

4.1 利用引物1、引物2进行单扩增



反应总体积25 μ l, 其中10倍浓度缓冲液 2.5 μ l(KCl 500 mmol, MgCl₂ 25 mmol, Tris HCl 100 mmol, pH 8.4, NP-40 0.4%, Tween-20 0.4%), 引物1 (25 pmol/ μ l) \cdot 1 μ l, 引物2 (25 pmol/ μ l) \cdot 1 μ l, 模板DNA 10 μ l, 加双蒸水至25 μ l, 先于94 $^{\circ}$ C 变性10 min, 各加 Taq DNA 聚合酶2.5单位, 以石蜡油覆盖, 再94 $^{\circ}$ C 60 s, 50 $^{\circ}$ C 60 s, 70 $^{\circ}$ C 60 s于DNA扩增仪上扩增40个循环, 最后一个循环于70 $^{\circ}$ C 保温420 s, 取10 μ l PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶上电泳, 紫外透射反射仪观察结果并照相保存结果。

4.2 Nest-PCR

反应体系及温度、时间同上, 以引物1、引物2为外引物扩增30循环后, 取10 μ l用于第2次扩增。内引物为引物3、引物4, 反应条件同上, 扩增30循环后, 最后一个循环于70 $^{\circ}$ C 保温420 s, 取10 μ l PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶上电泳, 紫外透射反射仪观察结果并照相保存结果。

5 Southern DNA 杂交

用西德 Boehringer Mannheim 生物化学试剂公司的地高辛寡核苷酸3'末端标记试剂盒对合成的寡核苷酸探针进行标记, 然后与 Southern 杂交制备的硝酸纤维膜进行杂交, 以地高辛标记和检测试剂盒中的检测试剂对杂交的硝酸纤维膜进行免疫检测。

结果

1 PCR 产物的证实

本实验采用 nest-PCR, 外引物扩增的 PCR 产物大小为262 bp (图1), 内引物扩增的 PCR 产物大小为165 bp (图2), 经 Southern DNA 杂交证实其产物为本实验特异性产物。

2 PCR 的敏感性与特异性

日本血吸虫的虫卵、尾蚴及成虫DNA均扩增出明显条带, 其敏感性经外引物40个循环单扩增即可检测到单个虫卵、单个尾蚴或针尖大小的成虫组织(图1), Nest-PCR 及非同位素的地高辛探针可将其敏感性进一步提高, 日本血吸虫虫卵经梯度稀释

图1 引物1、2经40循环PCR单扩增, 取10 μ l于1.5%琼脂糖凝胶上电泳1 DNA分子量标志; 100 bp DNA Ladder; 2 阴性对照; 3 单个虫卵的PCR产物; 4 单个尾蚴的PCR产物; 5 针尖大小成虫组织的PCR产物 图2 Nest-PCR扩增产物, 取10 μ l于1.5%琼脂糖凝胶上电泳 1 DNA分子量标志; 100bp DNA Ladder; 2 阳性对照; 单个虫卵; 3 奇异变形杆菌DNA; 4 伤寒杆菌DNA; 5 粪肠球菌DNA; 6 大肠杆菌DNA; 7 人基因组DNA 图3 日本血吸虫虫卵经梯度稀释后进行DNA抽提及PCR单扩增, 取10 μ l产物进行琼脂糖凝胶电泳, Southern 转移于硝酸纤维膜上后, 以地高辛标记的探针进行杂交 1 100个虫卵; 2 10个虫卵; 3 1个虫卵; 4 1个虫卵DNA抽提物的1/10; 5 1个虫卵DNA抽提物的1/100

Fig 1 Analysis of 10 μ l PCR product by agarose gel electrophoresis after 40 PCR cycles by using primer 1 and primer 2; Line 1: DNA molecular weight marker: 100 bp DNA Ladder; Line 2: Negative control; Line 3: A single egg of *S. japonicum*; Line 4: A single cercaria; Line 5: Pinpoint-size of adult worm tissue Fig 2 Analysis of 10 μ l Nest-PCR product were analyzed by agarose gel electrophoresis; Line 1: DNA molecular weight marker: 100 bp DNA Ladder; Line 2: Positive control; a single egg of *S. japonicum*; Line 3: *Bacillus proteus vulgaris* DNA; Line 4: *Salmonella typhi* DNA; Line 5: *Streptococcus faecalis*; Line 6: *Escherichia coli* DNA; Line 7: human leukocyte DNA Fig 3 Analysis of 10 μ l of the PCR product by Southern hybridization using oligonucleotide probe after the egg of *S. japonicum* were diluted in 10-fold series, after DNA extraction and PCR amplification; Line 1: 100 eggs; Line 2: 10 eggs; Line 3: 1 egg; Line 4: 10% of extracted DNA from a single egg; Line 5: 1% of extracted DNA from a single egg

后进行DNA 抽提,单个虫卵的抽提物的1/10经 PCR 扩增后,取10 μl 产物进行琼脂糖凝胶电泳, Southern 转移于硝酸纤维膜上后,以地高辛标记的探针进行杂交,即可获得阳性结果(图3)。常见的肠道细菌及人基因组DNA 对本实验无交叉阳性结果出现(图2)。

讨 论

目前国内外血吸虫病的诊断,除病原学检查外主要依赖于免疫学检测,然而免疫学检测方法仍有许多不尽人意之处:(1)迄今为止,未能获得一株既敏感性又好特异性强的单克隆抗体,故其敏感性与特异性均较差;(2)血吸虫处在成虫、毛蚴、尾蚴、虫卵等生活史不同时期的抗原性亦有所差异,这给单克隆抗体的检测带来了一定困难^[4-6]。PCR 方法是80年代中期发展的一种体外核酸扩增系统,以其敏感性高、特异性强的优点,在短短

数年内已被全世界许多科研机构及临床实验室所采用,但用 PCR 方法检测日本血吸虫基因,国内外尚未见报道。

我们用电子计算机在DNA 基因库中对日本血吸虫基因进行检索,共查到8个基因序列,其中编码免疫原性毛蚴抗原的基因共有3个:5D 基因、8C 基因和8I 基因,我们参考5D 基因作为设计引物。5D 基因共有560个核苷酸,在日本血吸虫基因组中为一重复序列,这对增进本实验的敏感性有益,所选择的4条引物序列,经计算机检索,证实其除与8I 基因具有同源性外,与曼氏血吸虫、埃及血吸虫及其他寄生虫无同源性,与DNA 库中的人基因序列无同源性。所选择的引物,经计算机检索,证实其不会形成自身二级结构如发夹样结构等。本实验所选择的引物和探针的DNA 序列如图4:

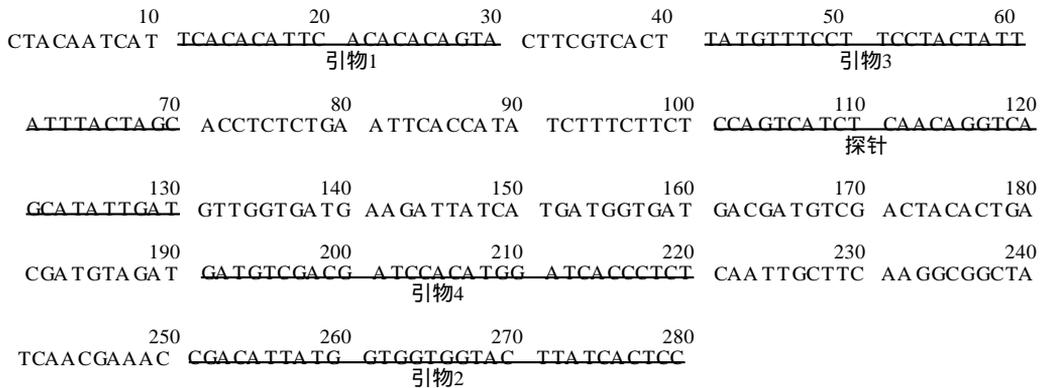


图 4 日本血吸虫5D 基因部分DNA 序列、引物及探针的位置

Fig 4 Partial sequence of Schistosoma japonicum 5D gene encoding an immunogenic miracidial antigen and sites of primers and probe

在 PCR 反应条件上,我们进行了反复摸索, MgCl₂ 浓度从 0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L、2.5 mmol/L、3.0 mmol/L、3.5 mmol/L、4.0 mmol/L、4.5 mmol/L 作梯度试验,以 2.5 mmol/L 工作浓度较为理想。温度调节最先选用 94 °C 60 s, 55 °C 60 s, 72 °C 60 s 的标准反应温度,扩增效果较差,降低退火温度后扩增效果改善,反复调整温度,发现以 93 °C 60 s, 50

60 s, 70 °C 60 s 效果较为理想。

日本血吸虫生活史中的不同阶段,其抗原性有所差异,这对免疫学诊断带来了困难,但不管其处于何种生活阶段,其所携带的基因是不变的。我们对日本血吸虫的成虫、尾蚴、虫卵标本进行 PCR 扩增,均取得了满意的效果,利用外引物进行单扩增,即可检测到单个虫卵、单个尾蚴及针尖大小的成虫组织。进行 Nest-

PCR 及非同位素地高辛探针, 可使敏感性进一步提高。

目前, 国内外日本血吸虫的 PCR 检测尚未见正式报道, 究其原因, 可能是因为日本血吸虫生活在肠肝循环中, 外周血中日本血吸虫 DNA 含量极少。我们采用 Nest-PCR, 即希望进一步增加敏感性, 以检测到外周血中可能存在的微量的日本血吸虫 DNA; 就本试验的敏感性而言, 如检测肝组织、肠组织、粪便、肠系膜静脉中的血标本, 以外引物作单扩增就足够了。下一步我们将在动物模型上进行证实。

利用计算机对基因库中现存的人类基因及寄生虫基因进行检测, 未发现与本实验所设计的引物具有同源性的基因存在, 这就对本实验的特异性有所保证, 肠道中常见的伤寒杆

菌、变形杆菌、大肠杆菌、粪肠球菌等作为对照, 亦未发现交叉阳性现象。

参 考 文 献

- 1 Mullis KB. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction *Methods in Enzymol* 1987; 155:335
- 2 陈一平, 翁心华, 徐肇玗, 等. 聚合酶链反应对结核杆菌 DNA 重复序列的检测 *上海医科大学学报* 1993; 20:81
- 3 陈一平, 翁心华, 徐肇玗, 等. 聚合酶链反应对胃活检标本中幽门螺杆菌 DNA 的检测 *中华传染病杂志* 1994; 12(3):141
- 4 彭道仪. 血吸虫病的控制——WHO 专家委员会第二次报告概述 *国外医学寄生虫病分册* 1994; 21(2):49
- 5 傅 奇. 血吸虫免疫学研究若干进展 *中华医学杂志* 1990; 70: 534
- 6 刘述先, 宋光承, 丁丽韵, 等. 日本血吸虫 24-26 kD 抗原和重组 Sj26 抗原的抗原性和免疫原性比较研究 *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1992; 10:190

1996年12月3日收稿 1997年11月26日修回

(编辑: 任燕芬)

EXPERIMENTAL STUDY ON DETECTION OF SCHISTOSOMA JAPONICUM 5D GENE BY USING PCR

Chen Yiping, Weng Xinhua, Xu Zhaoyue

Department of Infectious Diseases, Hua Shan Hospital,

Shanghai Medical University, Shanghai 200040

ABSTRACT

AM: To search for an effective method to diagnose the schistosomiasis and evaluate the effect of treatment **METHODS:** A PCR protocol was designed to detect the *Schistosoma japonicum* 5D gene encoding an immunogenic miracidial antigen in cercariae, eggs and adult worms **RESULTS:** Specific amplification of a 262 bp DNA fragment was achieved by using PCR and a 165 bp DNA fragment by using nest-PCR in cercariae, adult worms and eggs of *Schistosoma japonicum*. After 40 cycles by PCR, the product could be detected by agarose gel electrophoresis. This PCR protocol was able to detect as few as a single cercariae, a single egg or a pinpoint-sized tissue of adult *S. japonicum*. Nest-PCR and oligonucleotide probe hybridization could further increase the sensitivity. No specific PCR product was obtained with DNA from human leucocyte, *Escherichia coli*, *Bacillus proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis* and *Salmonella typhi* **CONCLUSION:** The sensitivity and specificity of this PCR protocol are satisfactory.

Key Words: Polymerase chain reaction, *Schistosoma japonicum*, 5D gene