

# 肺结核患者粪便 TB-DNA 提取方法的应用比较

吴 驰, 黄慧谦, 陈建波, 罗 凯, 肖颜玉, 叶飞娣, 单万水 (广东省深圳市第三人民医院 518112)

**【摘要】 目的** 比较煮沸裂解法、酚/氯仿法和试剂盒法 3 种 DNA 提取法在肺结核患者粪便标本中检测 TB-DNA 的应用效果。**方法** 收集肺结核患者粪便标本, 分别用煮沸裂解法、酚/氯仿法和试剂盒法提取 DNA, 比较其 TB-DNA 实时荧光聚合酶链反应(PCR)扩增的检测阳性率及扩增效率, 分析不同方法的差异。**结果** 对于痰抗酸涂片阴性患者的粪便标本, 3 种方法均未测到有 TB-DNA 扩增。痰抗酸涂片阳性患者的粪便标本, 煮沸裂解法、酚/氯仿法和试剂盒法的 TB-DNA 检出率分别为 45%、70% 和 80%。酚/氯仿法与试剂盒法 TB-DNA 的定量结果比较, 存在显著性差异, 试剂盒法提取扩增效果显著强于酚/氯仿法。**结论** 试剂盒法可有效去除粪便标本中的 PCR 抑制物, TB-DNA 检出率和定量结果明显优于煮沸裂解法和酚/氯仿法, 对于无法产生痰或咳出痰的肺结核患者的实验室诊断具有较高的应用价值。

**【关键词】** 肺结核; 粪便; DNA 提取; 实时荧光聚合酶链反应; 结核分枝杆菌

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 10. 027 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)10-1207-03

**Application comparison of three TB DNA extraction methods from stool samples of patients with pulmonary tuberculosis.** WU Chi, HUANG Hui-qian, CHEN Jian-bo, LUO Kai, XIAO Yan-yu, YE Fei-di, SHAN Wan-shui (The Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518112, China)

**【Abstract】 Objective** To Compare three DNA extraction methods including boiling lysis method, phenol/chloroform method, and kit method for TB DNA detection in stool specimens of patients with pulmonary tuberculosis. **Methods** Stool specimens of pulmonary tuberculosis patients are collected and treated separately with boiling lysis method, phenol/chloroform method and kit method. TB DNA positive detection rates and amplification efficiency of these three methods were analyzed and compared with real time PCR. **Results** TB DNA amplification was no detected in stool specimens of sputum smear negative patients. The TB DNA detection rates of these three methods were 45%, 70% and 80%, respectively. The quantitative result of TB DNA in the kit method group was significantly higher than that in the phenol/chloroform method group. **Conclusion** Compared with the other two methods, kit method can more effectively remove PCR inhibitors which has a high diagnosis value for pulmonary tuberculosis patients, who can not produce or cough up sputum.

**【Key words】** Pulmonary tuberculosis; Stool; DNA extraction; Real-time fluorescence PCR; Mycobacterium tuberculosis complex

肺结核的实验室诊断主要依靠检测痰标本中的结核分枝杆菌(TB)复合体。然而, 有些患者无法产生痰或咳出痰, 例如: 儿童、免疫功能低下的患者和神经反射受损的患者。在这种情况下, 临床常常考虑采用侵入性操作取得患者标本, 包括鼻咽管吸取物、胃液, 通过支气管镜获得的呼吸道分泌物等。侵入性操作获得上述标本, 不但加重了患者的痛苦, 还有增加医院感染风险的可能。

国外研究证明, TB 具有耐酸耐酶的特点, 结核分枝杆菌可存活于胃液和肠道中, 并经过消化后与粪便一起被排出<sup>[1]</sup>。然而, 由于提取机制和步骤的差别, 粪便标本中获得 TB-DNA 的量及纯度各不相同, 导致在后续试验, 如实时荧光聚合酶链反应(PCR)扩增等的应用效果不同。本文比较了煮沸裂解法、酚/氯仿法和试剂盒法这 3 种方法获得粪便标本中 TB-DNA 质与量的优劣, 为下一步快速检测儿童肺结核患者粪便的研究提供了方法学比较。

## 1 材料与方 法

**1.1 标本来源** 收集 2010~2011 年本院临床诊断为肺结核的住院患者粪便标本 30 例, 其中 20 例为痰抗酸涂片阳性患者, 10 例为痰抗酸涂片阴性患者。住院肺结核患者诊断标准符合下列条件之一: 痰支气管镜刷片查抗酸菌涂片阳性; 结核菌培养阳性; 其他治疗无效, 影像学检查符合肺部结核病诊断并正规抗结核治疗有效, 符合结核病演变过程。同时排除腹泻、便秘等肠道结核感染症状。

## 1.2 方法与试剂

**1.2.1 粪便标本预处理** 新鲜粪便标本收集在无菌塑料杯中, 取回实验室后 4℃ 冰箱保存, 时间不超过 48 h。取 500 mg 粪便标本加入装有 2 mL 无菌磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.4)的试管中充分振荡摇匀后, 3 500 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 重复上述磷酸盐缓冲液洗涤离心步骤 1 次, 最终收集上清液 1 mL 置于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中。然后上清液 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液后, 沉淀加入 1.5 mL 生理盐水中重悬混匀, 等分为 3 份后, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 保留沉淀, 置于-30℃ 冰箱中待抽提 DNA。所有标本在 1 h 内预处理完毕。

**1.2.2 煮沸裂解法提取 DNA** 使用 TB 核酸扩增 PCR 荧光检测试剂盒中自带 DNA 提取液, 提取液成分包括去污剂和 Tris 盐酸缓冲液, 试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司提供。将预处理后所得沉淀, 每管加入 50 μL DNA 提取液, 充分混匀, 100℃ 加热 10 min, 转至室温下 13 000 r/min 离心 5 min 即可, -30℃ 保存备用。

**1.2.3 酚/氯仿法提取 DNA** 将预处理后所得沉淀加入 300 μL 细胞裂解液(自配, 主要成分: 10 mmol/L Tris 盐酸缓冲液、1 mol/L 氢氧化钠、10 mmol/L 乙二胺四乙酸、生理盐水、0.2% 十二烷基硫酸钠), 振荡混匀, 于 100℃ 加热 15 min, 用酚/氯仿法纯化 DNA, 即加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 振荡混匀, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液移至加等体积苯酚/

氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1)的试管中,振荡混匀,10 000 r/min 离心 5 min,将上清液再移至新管中,加入等体积异丙醇,颠倒混合,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入无水乙醇 1 000  $\mu$ L 洗涤一次,10 000 r/min 离心 1 min,离心后弃上清液,将沉淀的 DNA 溶于 60  $\mu$ L 的双蒸水中,−30  $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.4 试剂盒法提取 DNA** 采用进口试剂盒(QIAamp DNA mini kit)提取 DNA。具体操作如下所述,向预处理所得沉淀中加入 100  $\mu$ L 试剂盒缓冲液 ATL,振荡至彻底悬浮;点动离心,管中加入 20  $\mu$ L 蛋白酶 K,振荡混匀,于 56  $^{\circ}$ C 温育至少 30 min;点动离心后加入 200  $\mu$ L 缓冲液 AL,振荡 15 s 混匀,70  $^{\circ}$ C 温育 10 min;点动离心,加入 200  $\mu$ L 无水乙醇,振荡 15 s 混匀,点动离心后小心将溶液全部转移入离心过滤柱中,8 000 r/min 离心 1 min;弃滤过液,将离心过滤柱转入新的离心收集管中,向离心过滤柱中加入 500  $\mu$ L 缓冲液 AW1,8 000 r/min 离心 1 min;弃滤过液,再将离心过滤柱转入新的离心收集管中,离心过滤柱中加入 500  $\mu$ L 缓冲液 AW2,13 000 r/min 离心 3 min;弃滤过液,再将离心过滤柱转入新的离心收集管中,13 000 r/min 离心 1 min;最后将离心过滤柱转入新的离心管中,向吸附膜的中间部位悬空加入 200  $\mu$ L 洗脱缓冲液 AE,室温放置 2 min,8 000 r/min 离心 2 min,离心管中收集的液体即所需。

**1.2.5 实时荧光 PCR 检测** TB 核酸扩增 PCR 荧光检测试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司提供。根据试剂说明书操作,分装 PCR 反应液并加入提取的 DNA、标准品和阴阳性对照作为 PCR 扩增模板,放入 ABI7500 荧光 PCR 仪上进行扩增。根据标本的实时荧光曲线形态判断结果的阴阳,通过实时荧光 PCR 的 *ct* 值(每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环判断数)和定量标准方程计算 TB-DNA 定量值,作为提取与扩增效果的评价指标。

**1.3 统计学方法** 记录 3 种提取方法的实时荧光 PCR 结果,采用  $\chi^2$  检验和配对 *t* 检验进行统计学处理,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 痰涂片阴性患者粪便 TB-DNA 检出情况** 10 例痰抗酸涂片阴性患者的粪便标本分别采用煮沸裂解法、酚/氯仿法和试剂盒法,这 3 种方法提取 DNA 作为模板,进行 TB IS6001 转座子基因实时荧光 PCR,结果显示均未检测到有 PCR 扩增。

**2.2 痰涂片阳性患者粪便 TB-DNA 检出情况** 见表 1。由表 1 可见,20 例痰抗酸涂片阳性患者的粪便标本采用煮沸裂解法提取 DNA 作为模板,进行实时荧光 PCR,9 例检出 TB-DNA,检出率为 45%;采用酚/氯仿法提取 DNA,14 例检出 TB-DNA,检出率为 70%;采用试剂盒法提取 DNA,16 例检出 TB-DNA,检出率高达 80%。试剂盒法检出阳性率最高,煮沸裂解法与其相比,TB-DNA 检出率差异有统计学意义( $\chi^2=5.227$ ,  $P<0.05$ );酚/氯仿法分别与煮沸裂解法相比,TB-DNA 检出率均差异无统计学意义( $\chi^2=2.558$ ,  $P>0.05$ ),与试剂盒法比较,TB-DNA 检出率差异也无统计学意义( $\chi^2=0.533$ ,  $P>0.05$ )。

表 1 3 种提取方法对 TB-DNA 的实时荧光 PCR 检测结果( $n=20$ )

| 方法    | TB-DNA 阳性 | 检出率(%) |
|-------|-----------|--------|
| 煮沸裂解法 | 9         | 45     |
| 酚/氯仿法 | 14        | 70     |
| 试剂盒法  | 16        | 80     |

**2.3 酚/氯仿法与试剂盒法 TB-DNA 定量结果比较** 见表 2。

20 例痰抗酸涂片阳性患者的粪便中,有 14 例标本采用酚/氯仿法与试剂盒法提取 DNA,结果均检测到有 TB-DNA 扩增。取实时荧光 PCR 的定量值作为提取与扩增效果的评价指标,对酚/氯仿法与试剂盒法 TB-DNA 定量结果进行比较。采用配对 *t* 检验分析,两种方法之间差异有统计学意义( $t=2.189$ ,  $P<0.05$ ),试剂盒法 DNA 提取扩增效果显著强于酚/氯仿法。

表 2 酚/氯仿法与试剂盒法对粪便标本 TB-DNA 定量结果的比较

| 样本    | 酚/氯仿法 | 试剂盒法  | 差值    |
|-------|-------|-------|-------|
| 样本 1  | 3.488 | 5.045 | 1.557 |
| 样本 2  | 5.251 | 6.915 | 1.664 |
| 样本 3  | 2.631 | 4.427 | 1.796 |
| 样本 4  | 4.144 | 4.753 | 0.609 |
| 样本 5  | 2.788 | 3.790 | 1.002 |
| 样本 6  | 3.756 | 5.089 | 1.333 |
| 样本 7  | 1.863 | 2.734 | 0.871 |
| 样本 8  | 3.853 | 5.195 | 1.342 |
| 样本 9  | 3.325 | 4.083 | 0.758 |
| 样本 10 | 3.005 | 5.288 | 2.283 |
| 样本 11 | 4.251 | 5.863 | 1.612 |
| 样本 12 | 4.597 | 5.998 | 1.401 |
| 样本 13 | 1.176 | 4.371 | 3.195 |
| 样本 14 | 4.040 | 4.849 | 0.809 |

3 讨 论

粪便标本中细菌 DNA 提取的最主要问题是粪便标本中各种杂质和干扰物极多,抽提过程中常常发生抑制物共纯化,导致其阻遏下游 PCR 扩增<sup>[2]</sup>,众多杂质也会导致背景的干扰等。本研究用 3 种方法制备的粪便标本 DNA 均能用于 PCR 扩增的模板。煮沸裂解法是一种经典方法,操作最简单且价格低廉,但提取的 DNA 完全没有经过纯化去除杂质和干扰物,TB-DNA 的量及纯度均较低,严重抑制了后续的 PCR,TB-DNA 检出阳性率最低,仅有 45%。利用酚/氯仿法可以有效去除粪便中的色素和多糖成分,但操作要求较高且复杂,并且酚/氯仿法中的酚也可能抑制后续的 PCR。本研究中,酚/氯仿法 TB-DNA 检出阳性率为 70%,虽然与试剂盒法的 80% TB-DNA 检出阳性率相比,差异无统计学意义;但进一步分析,以实时荧光 PCR 的定量值作为提取与扩增效果的评价指标,对酚/氯仿法与试剂盒法 TB-DNA 定量结果进行比较,差异有统计学意义,由此说明了试剂盒法 TB-DNA 提取扩增效果显著强于酚/氯仿法,试剂盒法提取 TB-DNA 的效率更高,质量更稳定,易标准化,更适合实验室诊断研究。但是,试剂盒法费用高昂不易普及;还有在试剂盒法操作过程中需注意,有时会出现粪便标本蛋白酶消化不完全所致试剂盒中的柱子阻塞的现象,这会导致 DNA 提取效率大大降低,因此标本需经足量蛋白酶充分温育消化,以避免此现象发生。国内文献通常采用分光光度仪测定 DNA 浓度及 A260/280 纯度<sup>[3]</sup>来判断提取细菌基因组 DNA 的质与量,或者普通 PCR 扩增后产物电泳、溴化乙锭染色后在紫外灯下检测<sup>[4]</sup>,根据亮度强弱来评价不同方法的 DNA 提取扩增效果。但是,分光光度仪测定结果判定缺乏对目标基因的特异性,且不能区别是否发生抑制物共纯化;普通 PCR 的重复性较差,结果判断带有一定的主观性,对同一样本检测结果的变异系数可达 10% 以上,而且普通 PCR 检测的是扩增产物的最终浓度而非起始浓度。在本研究中,选用荧光定量 PCR 替代普通 PCR 来评价不同方法间的 DNA 提取效果。因为,国内外研究发现,荧光定量 PCR 具有以下优点:重复性好,对同一样本重复检测结果的变异系数基

本小于 3%<sup>[5]</sup>;灵敏度较高,可区分被测定模板 DNA 之间数量上的细微差异;荧光定量结果代表的是模板 DNA 的起始浓度,可以更客观地反映提取液中模板 DNA 的数量与质量,便于统计分析。经过本研究中的数据比较分析,本文认为,实时荧光 PCR 确实是一种比较先进可信的评价 DNA 提取扩增效果的方法。

本研究还分别对痰抗酸涂片阴性和阳性的肺结核患者粪便标本 TB-DNA 的检测特异性和灵敏度进行了统计分析。痰抗酸涂片阴性患者的粪便标本,采用 3 种方法提取 DNA,进行结核杆菌种属特异性 IS6001 转座子基因实时荧光 PCR,结果显示均未检测到有 PCR 扩增;痰抗酸涂片阳性患者的粪便标本,采用试剂盒法提取 DNA,荧光 PCR 扩增 TB-DNA 检出率可达 80%。粪便标本 PCR 与痰抗酸涂片相比,结果基本一致,特异性高但灵敏度略低。本研究结果与国外 Amel 等<sup>[6]</sup>和 Hilary 等<sup>[7]</sup>的研究结果相符。

综上所述,使用试剂盒法提取细菌 DNA 和实时荧光定量 PCR 检测粪便标本中 TB-DNA,可能是一种特异性高、中度敏感的 TB 实验室初筛方法。粪便标本检测阳性的患者,可避免多项侵入性检查操作,并且粪便 PCR 检测只需耗时 1 d,检测速度远远快于时间长达数星期的 TB 培养。提取的阳性 TB-DNA 还可以进一步进行 TB 耐药基因突变的相关检测<sup>[8]</sup>。对于无法产生痰或咳出痰的肺结核患者,例如:儿童、免疫功能低下的患者和神经反射受损的患者,收集其粪便标本进行实时荧光定量 PCR 检测 TB-DNA 具有较高的诊断应用价值。

## 参考文献

[1] Vandal OH, Pierini LM, Schnappinger D, et al. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosome

mal Mycobacterium tuberculosis[J]. Nat Med, 2008, 14: 849-854.

- [2] Deuter R, Pietsch S, Hertel S, et al. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples[J]. J Microbiol Methods, 2002, 50(2): 131-139.
- [3] 郭世奎, 王昆华, 龚昆梅, 等. 结直肠癌患者粪便细菌 DNA 提取方法的比较研究[J]. 云南医药, 2009, 30(5): 520-523.
- [4] 扬德君, 吴襟, 刘毅, 等. 一种快速提取肠道微生物总 DNA 的方法[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(2): 91-93.
- [5] 王忠发. 病原微生物 DNA 的超快速提取方法建立与应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(9): 1979-1981.
- [6] Amel EK, Mireille H, Didier R, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex organisms in the stools of patients with pulmonary tuberculosis[J]. Microbiology, 2009, 155: 2384-2389.
- [7] Hilary W, Melissa M, Robert HG, et al. Diagnosis of Pediatric Pulmonary Tuberculosis by Stool PCR [J]. Am J Trop Med Hyg, 2008, 79(6): 893-898.
- [8] Julianna C, Ron S, Robert HG, et al. Evaluation of Molecular Tools for Detection and Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis in Stool Specimens from Patients with Pulmonary Tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1820-1826.

(收稿日期: 2011-12-25)

(上接第 1206 页)

在预防时限来看,有 91 例患者得到了足够疗程抗凝预防,8 例患者药物预防的时间短于指南所规定的最少 10 d 的预防时限。(3)预防深静脉血栓所选用的药物:①完全不符合指南推荐的有 19 例,选用的药物均为活血化瘀的中成药;②基本符合指南推荐的有 60 例,即选用的药物中既有指南推荐的低分子肝素,而且基本都是在术后 24 h 内即开始使用,但这 60 例中同时合用了一种或者几种活血化瘀的中成药;③完全符合指南推荐药物的有 20 例。

## 3 讨论

总体而言,该院在预防骨科大手术后 DVT 的药物预防方面基本能够遵循指南的要求,选择指南中推荐的药物并按照指南推荐的开始时间以及给药时限给予相应的预防措施。但是,在药物的选择等方面存在种种问题,主要表现如下。

**3.1 药物的选择不正确** 药物选择不正确可能包括几个方面的原因,其一可能是因为医生本身的用药习惯以及我国习惯使用活血化瘀药物的传统和悠久历史;其二可能是指南中一些更加安全的、新型的抗凝药物还没有进入该院,比如利伐沙班、磺达肝羧酸钠。

**3.2 开始预防的时间以及时限不正确** 骨科大手术围手术期 DVT 形成的高发期是术后 24 h 内,所以预防应尽早进行。但术后越早进行药物预防,发生出血的风险也越高。因此,确定 DVT 形成的药物预防开始时间应当慎重权衡风险与收益。调查数据显示,该院有近一半用药时间选择不对,其中大部分为过早使用抗凝药物,且术前未停用抗凝药物,这样既造成了药

物浪费,又增加了出血风险。

## 参考文献

- [1] Geerts WH, Pineo GF, Heit JA, et al. Prevention of venous thromboembolism; the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy [J]. Chest, 2004, 126 (3 Suppl): S338-400.
- [2] Arcelus JJ, Kudrna JC, Caprini JA. Venous thromboembolism following major orthopedic surgery: What is the risk after discharge[J]. Orthopedics, 2006, 29(6): 506-516.
- [3] 中华医学会骨科学分会. 中国骨科大手术静脉血栓栓塞症预防指南[J]. 中华关节外科杂志: 电子版, 2009, 3(3): 380-383.
- [4] Karanjit SM, Akshay M, Idnan Y, et al. Venous thromboprophylaxis in trauma: a review[J]. Trauma, 2006, 8(4): 233-247.
- [5] Piovela F, Wang CJ, Lu H, et al. Deep vein thrombosis rates after major orthopedic surgery in Asia: an epidemiological study based on postoperative screening with centrally adjudicated bilateral venography[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(12): 2664-2670.
- [6] 俞光荣. 骨科大手术围手术期 VTE 的评估与预防[J]. 同济大学学报: 医学版, 2010, 31(1): 1-4.

(收稿日期: 2011-12-23)