

基于 DNA 荧光染色法的肺炎支原体检测研究

李瑶玲 李 慧 龚蕊茵 阳 乐 崔小莹*

长沙医学院 410200

【摘要】肺炎支原体是下呼吸道感染的重要病原之一, 不仅引起非典型肺炎, 还可引起多种呼吸系统的疾病, 甚至严重肺炎及肺外并发症, 婴幼儿尤其易感。所以如何在发病前期检测出婴幼儿是否患肺炎, 就需要能够提前进行排查, 这样就能降低发病率。因此, 快速检测出肺炎支原体对本病的早期快速诊断很有必要。本实验运用 DNA 荧光染色法, 该技术把 PCR 的高灵敏度性, DNA 杂交探针的高特异性和光谱技术的高精度确定量融为一体, 时间较短, 操作简单, 能够对支原体污染的程度进行定量观察。

【关键词】肺炎支原体; PCR 检测敏感性试验; 荧光染色法

【中图分类号】R72

【文献标识码】A

【文章编号】1005-4596 (2019) 01-009-02

【基金项目】长沙医学院大学生研究性学习和创新性实验研究项目——长医教[2017]18号-187

肺炎支原体是一种介于细菌与病毒间且有细胞结构、无细胞壁的最小原核细胞型微生物, 其主要通过呼吸道飞沫进行传播^[1], 潜伏周期为 2-3 周, 婴幼儿是其高危人群, 一年四季均可发病。肺炎支原体不仅引起支原体肺炎、哮喘发作等呼吸道疾病, 还会引起多种肺外综合症, 如脑炎、心肌炎、肝炎、肾炎等多系统, 多器官疾病, 有时还会因器官衰竭而死亡, 对人类健康构成了极大威胁。

现如今对肺炎支原体 IgM 检测方法都从肺炎支原体的敏感性、特异性和准确度着手, 分别分为血清学抗体检验法、培养法、PCR 法。但是这几种方法都存在一些不足。如血清学抗体检验法, 虽然肺炎支原体感染对肺炎支原体 IgM 是最早出现的特异性抗体, 其滴度受到患儿年龄病程, 免疫系统的影响。此外, 在临床实践中双份血清获取困难, 且肺炎支原体感染后高滴度抗体可在感染后保持数日, 难以区别现在感染于既往感染, 因此血清学抗体检测方法只能作为肺炎支原体感染的辅助诊断。如培养法, 因为影响因素较多, 肺炎支原体营养要求高, 并且生长极为缓慢, 采样、运送及接种缓解等各方面因素都可能会出现假阴性的结果, 从而限制了其临床应用; 同样常规 PCR 也存在许多影响因素, 如标本质量, 模板浓度, 引物等都能降低 PCR 检测的阳性率, 且 PCR 扩增产物的后期处理, 不仅耗时而且易污染而造成假阳性结果, 严重制约了 PCR 方法在临床的推广应用, 但 DNA 荧光标记探针法实现其定量功能, 在此方法中, PCR 产物累积的每个循环都能被实时监控和分析, 分析达到荧光阈值的循环数就可以直接报告出 DNA 起始拷贝数。此方法中, 探针以闭管模式在扩增的同时, 检测目标基因, 从而可以增加特异性和降低交叉污染的可能性, 运用该技术, 我们可以对 DNA、RNA 样品进行定量的定性分析, 还可利用特异性探针进行基因型分析及基因变异的检测。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

主要仪器: 支原体试剂盒, 荧光显微镜, 离心分离机, 电泳槽, 电泳仪。

1.2 试剂

主要试剂: DNA 荧光染料, 蒸馏水, 琼脂糖。

2 方法

2.1 进行预实验

2.2 采集样本

在长沙医学院附属第一医院儿科内采集患儿的 DNA, 密封送检, 标本立即用于测试或保存 -20℃ 待测, 保存期不超过一周。

2.3 试剂制备

配制 DNA 荧光染料, 严格按照《中国药典》的要求配制 DNA 荧光染料液。

DNA 荧光染料的配制: Hoechst33258:5 mg, 无菌 Hank's 平衡液:90 ml, 1% 硫柳汞溶液:10 ml, 混合 30min, 使用

0.22 μm 滤膜过滤制成 DNA 荧光染料。使用时用 Hank's 平衡液稀释 100 倍。冰醋酸 1 份, 甲醇 3 份, 混合后制成固定液; 0.1mol/L 枸橼酸 22.2 ml, 0.2 mol/L 磷酸氢二钠 27.8 ml, 甘油 50ml, 混合后调整 pH 值 5.5, 0.22 μm 滤膜过滤除菌制成封固液。

2.4 肺炎支原体 DNA 提取

以灭菌水溶解至样品使用体积, 将样本 10000r/min 离心后去上清。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒取 50 μL 样本提取 DNA, -20℃ 保存。

2.5 常规 PCR 检测

根据 GenBank 提供的 CARDS 毒素蛋白的基因序列, 筛选目的基因序列, 通过引物分析软件 Primer5.0 设计引物。

2.6 DNA 荧光染色

将提取好的 DNA 进行培养, 待细胞在盖玻片上贴壁生长约 80%, 取出盖玻片用 PBS 液洗涤 1 次, 于滤纸上风干后放入固定液中固定 5min, 弃固定液, 换上新的固定液再固定 10min。取出盖玻片风干后浸泡于 DNA 荧光染色工作液内, 避光染色 30min。弃染色液, 盖玻片用蒸馏水冲洗 3 次, 风干后备用。取干净的载玻片, 滴 1 滴封固液, 将染好的盖玻片的细胞面朝下, 置于载玻片上, 轻压使盖玻片固定在载玻片上。在 400 倍视野下观察, 阴性对照 (无支原体感染的细胞样品) 只见细胞核有荧光; 阳性对照除细胞核可见荧光外, 还有核外荧光。^[2] 提取肺炎支原 DNA 进行荧光定量 PCR, 选取经 PCR 荧光探针法测定合适浓度的 DNA 为下一实验标本。

2.7 做出探针

设计出肺炎支原体的探针。

3 结论

我们的基于 DNA 荧光染色法的肺炎支原体检测的方法是需先收集样本, 提取其 16S rDNA 进行荧光定量 PCR, 选取经 PCR 荧光探针法选取下一步实验标本, 离心后取上清置于 -80℃ 备用, 然后再对其进行应用 PCR 扩增, 从 NCBI 中检索 16S rRNA 基因序列, 根据突变热点区自行设计 PCR 引物, 对扩增产物进行电泳检测鉴定, 接下来对 16S rDNA 基因测序, 经电泳检测阳性的标本经乙醇纯化后作双脱氧末端终止法全自动 DNA 测序, 再与标准 16S rDNA 基因做对比, 最后进行临床资料比较, 统计学处理。用 DNA 荧光染色法, 该技术把 PCR 的高灵敏度性, DNA 杂交探针的高特异性和光谱技术的高精度确定量融为一体, 时间较短, 操作简单, 能够对支原体污染的程度进行定量观察。实时定量 PCR 法检测残余 DNA 含量, 该方法较之目前的 DNA 探针杂交法及荧光染色法具有更高的灵敏度, 可以满足超出 DNA 探针杂交法或荧光染色法检测范围的生物制品的质控要求; 用时短, 特异性强; 但是对引物的设计要求较高, 因此需要对该方法进行优化以达到最佳的检验效果。^[3] DNA 荧光染色法检验时间较短, 操作简单, 能够对支原体污染的程度进行定量观察, 但需要的检验的仪器较高, 适合于实验室研究。

* 通讯作者: 崔小莹

2.3 不同专业、不同年级医学本科生的临床思维了解程度比较
临床医学专业本科生的临床思维了解率较其他专业本科生高 ($P<0.05$), 见表 6, 三年级医学本科生的临床思维了解率较一、二年级高 ($P<0.05$), 见表 7。

表 6: 不同专业医学本科生的临床思维了解程度比较

专业	n	了解程度		
		完全了解	部分了解	缺乏了解
临床医学专业	224	176	39	9
中医学	99	45	21	33
针灸推拿学	62	32	19	11
药学	75	41	25	9
医学检验学	158	78	43	37
医学影像学	152	72	70	10
护理学	170	69	56	45
预防医学	60	49	6	5

注: 临床医学专业医学本科生的临床思维了解率高于其他专业。

表 7: 不同年级医学本科生的临床思维了解程度比较

年级	n	完全了解	部分了解	缺乏了解
一年级	333	172	85	76
二年级	337	185	88	64
三年级	330	205	106	19

注: 三年级医学本科生的临床思维了解率高于一年级、二年级。

3 讨论

当前医学模式已从比较局限的生物医学模式转变为科学的生物—心理—社会医学模式。传统的生物医学模式在诊治疾病过程中“只见病, 不见人”, 在这种模式下形成的临床思维忽视疾病的心理、社会因素^[3]。现代医学模式则要求临床医生从病人的社会

背景和心理变化出发, 结合生理与病理现象, 对病人所患疾病进行全面的分析及诊断^[4]。应用现代临床思维, 能形成有利于病人的综合诊断、治疗、康复、预防方案, 从而提高临床诊治质量^[5]。

为更好的培养医学本科生的临床思维, 本研究对 1000 名医学本科生的临床思维认知现状进行调查, 根据专业和年级的不同对调查结果进行分析, 结果显示不同专业、不同年级的医学本科生的临床思维获知途径均以课堂教学为主, 临床医学专业本科生的临床思维了解率最高, 为 95.98% (215/224), 与其他专业比较差异均有统计学意义, 三年级本科生的临床思维了解率为 94.24% (311/330), 与其他年级本科生比较差异均有统计学意义。

综合分析上述研究结果, 本研究得出医学本科生基本知晓临床思维, 但不同专业、不同年级本科生的临床思维了解程度有较明显的差异, 临床医学专业的本科生和高年级本科生的临床思维了解率相对较高。建议医疗院校结合学生的临床思维了解现状完善教学方案和教学目标, 以促进学生临床思维水平的提升。

参考文献

- [1] 宋俊岩, 朱秀丽, 苗秀欣, 等. 360 名医学院校本科生临床思维能力及影响因素分析 [J]. 护理学报, 2014, 21(17):1-4.
- [2] 宋凡, 杨光耀, 元来华. 临床医学学生临床思维能力的培养分析 [J]. 中国继续医学教育, 2017, 9(1):39-40.
- [3] 李杰, 李政霖, 王傲云, 等. 导师制在医学本科生培养中的积极作用 [J]. 中华医学教育探索杂志, 2017, 16(7):693.
- [4] 杨海燕, 冯慧芬, 靳荣荣. 临床本科医学生实践教学现状及对策分析 [J]. 河南医学研究, 2016, 25(6):1021-1023.
- [5] 王健, 赵琦, 祝培珠, 等. 在校医学本科生对《全科医学概论》课程的评价和全科医学认知状况的调查研究 [J]. 中华全科医师杂志, 2018, 17(11):901.

(上接第 9 页)

参考文献

- [1] 徐凤琴, 张琪, 毕良学. 支气管肺泡灌洗液肺炎支原体核酸联合血清特异性 IgM 检测对儿童肺炎支原体感染的诊断价值 [J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(1):35-37.

- [2] 余华, 杜永凤, 严玉宝, 何信群, 胡娟, 周岷江, 崔鹏博. DNA 荧光染色法和培养法在支原体检测中的比较 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(08):4039-4041.

- [3] 洪庆福, 刘海侠, 张红霞, 陈会珍, 赵楠. 荧光染色法检测重组人促红素残余 DNA 含量 [J]. 科技展望, 2016, 26(15):61.

(上接第 10 页)

为常规术后辅助治疗措施。与此同时, 部分临床相关专家指出, 鼻窦属于人体较为脆弱的部位, 对该类患者实施相应的鼻内镜手术后仅采取常规生理盐水灌洗等辅助措施难以有效预防切口感染、肺内感染等一系列术后并发症, 而布地奈德属于新型长效糖皮质激素, 可在确保患者溶酶体膜稳定性的同时对其炎症细胞与介质的合成与释放产生相应的抑制作用^[5], 既有利于提高手术疗效, 同时还能进一步降低其术后并发症发生率, 营造理想的预后效果。在本文研究中, 两组患者在临床疗效、VAS 评分等一系列临床相关指标中均存在统计学差异 (观察组均优于传统组, $P<0.05$), 与上述结论相符, 且进一步体现了布地奈德鼻喷雾剂对慢性鼻—鼻窦炎伴变应性鼻炎患者行鼻内镜手术后的重大应用意义。

参考文献

- [1] 刘学良, 雷刚. 鼻内镜手术后使用布地奈德鼻喷雾剂治疗慢性鼻—鼻窦炎伴变应性鼻炎的临床观察 [J]. 中国药房, 2017, 28(02):215-219.

- [2] 朱莹, 李春华, 祁浩. 鼻内镜手术后使用布地奈德鼻喷雾剂治疗慢性鼻—鼻窦炎伴变应性鼻炎的临床观察 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(88): 205-206.

- [3] 胡菁, 朱宁, 张建. 通窍鼻炎颗粒对慢性鼻窦炎伴鼻息肉远期复发的影响及其机制研究 [J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2018, 26(06):431-435.

- [4] 付森博. 鼻内镜手术后使用曲安奈德鼻喷雾剂治疗慢性鼻—鼻窦炎伴变应性鼻炎的临床效果分析 [J]. 辽宁医学杂志, 2018, 32(06):18-36.

(上接第 11 页)

疾病恢复过程中的负面情绪, 优化心理状况, 提升患者整体生活质量, 恢复效果更为理想。

参考文献

- [1] 朱薇. 试论肝硬化优质护理措施 [J]. 健康前沿, 2017, 26(10):39.

- [2] 许俊. 优质护理中强化健康教育对肝硬化患者出院后的影响研究 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2017, 22(4):576-578.

- [3] 王丽娟. 浅析肝硬化护理中全程优质护理的应用 [J]. 中外女性健康研究, 2017, (1):82-82, 85.

- [4] 王新华. 优质护理在乙型肝炎后肝硬化伴上消化道出血中的应用 [J]. 国际护理学杂志, 2018, 37(18):2497-2499.