

支原体全 DNA 光敏生物素 探针杂交方法的建立^①

赖小敏^② 方国源 王传恩 李彩霞

(中山医科大学微生物学教研室, 广州, 510089)

提 要 支原体基因组全 DNA 分子量较小, 本研究直接制备肺炎支原体(MP), 人型支原体(MH)和解脲脲原体(UU)中 3 个型 SU₁, SU₄, SU₈ 全 DNA 光敏生物素探针, 用斑点杂交鉴定表明探针可用于检测同种支原体, 但 3 个型 UU 探针不能用于型别鉴定。探针检测灵敏度较一般片段 DNA 探针灵敏度低, 可能是由于前者分子量较大, 降低了杂交速率和效率。直接提取全 DNA 作光敏生物素标记, 简化了探针制备过程, 且无放射性损害及衰减, 探针易于保存, 可供一般实验室及化验室使用。

主题词 支原体属/遗传学; DNA 探针; 核酸杂交/方法

中图分类号 R375

在各种人类支原体中, 肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)已肯定为原发性非典型性肺炎主要病原之一, 而解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*, UU)和人型支原体(*Mycoplasma hominis*, MH)被认为与非淋菌性尿道炎等性接触性传染病有密切关系。由于支原体基因组 DNA 分子量较小, 我们制备了 MP, MH 及 UU 的第 1、4、8 血清型全 DNA 光敏生物素标记探针, 并应用斑点杂交试验进行了探针特性鉴定, 现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 菌 种

MP FH 株, MH 为北京首都儿科研究所赠, UU 1~14 血清型标准株由加拿大 Alberta 大学 Robertson 博士提供。

1.2 标记及检测用试剂与仪器

标记用的光敏生物素、特种紫外光照灯及探针碱性磷酸酶检测试剂盒, 均购自中国军事医学科学院放射医学研究所。

1.3 支原体全 DNA 提取及其标记

用相应培养基分别培养 MP FH 株, MH, 第 1、4、8 型 UU 标准株(以下分别简称为 SU₁, SU₄, SU₈) 500 ml, 至对数生长晚期时在 4℃低温以 17 000 r/min 离心 40 min, 沉淀物用 PBS 洗涤 2 次, 末次离心沉淀物用 5 ml 支原体再悬浮缓冲液(0.1 mol/L EDTA Na₂+0.15 mol/L NaCl pH 8.0)配成浓缩菌混悬液, -30℃保存备用。

参照 Marmur^[1]方法, 5 ml 浓缩支原体液用 SDS 裂解菌体, RNase A (Sigma) 消化 RNA, 酚/氯仿抽提, 最后上清液以 2.5 倍体积无水乙醇沉淀, 真空抽干后, 用 0.1 mmol/L EDTA 溶解, 紫外分光光度计测定浓度, 电泳鉴定为一条带即为全 DNA, 可用于制备探针。

① 国家自然科学基金资助课题;

② 第一作者, 1963 年出生, 男, 讲师

上述支原体全 DNA 分别加等体积 1 g/L 光敏生物素,用特种紫外光照灯照射 20 min,以正丁醇萃取 2 次,乙醇沉淀,桔红色沉淀物抽干后用 EDTA 溶解,测定探针浓度,同时电泳显示为一条带可作进一步试验。

1.4 探针的斑点杂交鉴定

如上支原体全 DNA 分别作系列对倍稀释,用 1 μ l 在硝酸纤维膜(NC 膜)上点样,以相应阳性、阴性、本文所述其他种与型支原体全 DNA 作对照。按常规斑点杂交法进行操作,碱性磷酸酶系统显色,出现蓝紫色斑点为阳性反应。

2 结 果

2.1 探针的灵敏度

附表及附图显示,5 种探针所需浓度大致在 0.1~0.21 mg/L,可检测出相应全 DNA 核酸 0.8~1.2 ng。

附表 5 种探针的敏感性及其相应支原体全 DNA kb 数

探针种类	探针浓度 ¹⁾	可检核酸 ²⁾	全 DNA 分子 kb 数
MP	0.210	0.9765	800
MH	0.188	0.9521	700
SU ₁	0.125	1.0253	760
SU ₄	0.200	0.8056	910
SU ₈	0.175	1.1718	890

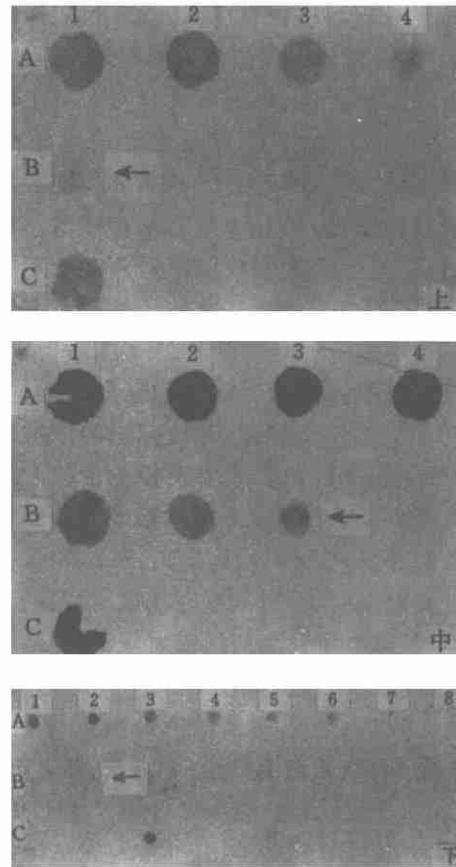
1) $\rho_{\text{B}}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 2) m/ng

2.2 探针的特异性

从附图斑点杂交结果说明,MP、MH 及 UU 3 种支原体间交叉反应不明显,而在 UU 中,SU₁,SU₄,SU₈ 间则互有交叉斑点出现,提示探针的种特异性高,但不能用于 UU 的型特异性鉴定。

2.3 探针的稳定性及重复性

将探针置-20℃半年后重复试验,斑点显示与前结果一致。



附图 支原体全 DNA 探针灵敏度和特异性

1) 上图为 MP 探针,使用浓度 0.210 mg/L。A 及 B₁₋₄ 为系列对倍稀释 MP 全 DNA, 1 μ l/孔,箭头所指 B₁ 全 DNA 量 0.9765 ng,为探针所能检测到目的核酸的最低量,C₁₋₄ 分别为阳性、阴性 MH,SU₄ 对照。2) 中图为 MH 探针,使用浓度 0.188 mg/L 及 B₁₋₄ 为系列对倍稀释 MH 全 DNA, 1 μ l/孔,箭头所指 B₃ 全 DNA 量为 0.9521 ng,为探针所能检测到目的核酸的最低量,C₁₋₄ 分别为阳性、阴性 MP,SU₄ 对照。3) 下图为 SU₄ 探针,使用浓度 0.20 mg/L; A,B₁₋₈ C₁₋₂ 为系列对倍稀释 SU₄ 全 DNA, 1 μ l/孔,箭头所指 B₂ 全 DNA 量为 0.8056 ng,为探针所能检测到目的核酸的最低量,C₃₋₈ 分别为阳性、阴性 MH,MP,SU₁,SU₈ 对照

3 讨 论

支原体基因组 DNA 分子量较小, kb 数只有大肠杆菌基因组 DNA kb 数的 1/6,大致在 700~1 600 kb 之间(本文所试支原体 kb 数如上表所示),因此能直接提取其全 DNA 制备成探针,而不需酶切、提纯 DNA

片段作标记,简化了探针制备过程。我们制备的 MP, MH, SU₁, SU₄, SU₈ 全 DNA 光敏生物素探针,可用于支原体种的鉴定,与日本学者报道 MP 的全 DNA 探针只对 MP 出现强斑点,而对其他支原体不出现斑点结果相符^[3]。所试 SU₁, SU₄, SU₈ 探针不但能与相应型出现强斑点,而且 3 型间互有强弱不等斑点出现,提示 3 型间核酸序列存在一定同源性,各型 UU 全 DNA 光敏生物素探针在 UU 检测中不能用于型别鉴定。

探针制备采用光敏生物素作为标记物,核酸能直接用于标记,一次标记的核酸量可达 $\mu\text{g}\sim\text{mg}$ 级,尤其适用于分子量较大如支原体全 DNA 的标记。本结果表明用光敏生物素直接标记 MP, MH, SU₁, SU₄, SU₈ 制备探针是成功的。探针杂交时无放射性损害,置 -20°C 保存半年后杂交结果重复性仍好,可供一般实验室或化验室使用。

杂交时,我们所用的探针浓度为 $100\sim 210\ \mu\text{g}/\text{L}$,只能检测到全 DNA 核酸 $0.8\sim 1.2\ \text{ng}$,而一般光敏生物素探针用 $80\sim 120\ \mu\text{g}/\text{L}$,可检出目的核酸 $0.5\sim 5\ \text{pg}$,提示所制备探针灵敏度比常规低 $100\sim 1\ 000$ 倍。分析原因可能由于全 DNA 分子量较大,同一 DNA 分子中同源序列多,变性时解链可能不完全,同时退火过程中又有部分 DNA 分子很快回复成双链,降低了杂交速率和效率。

支原体全 DNA 光敏生物素探针杂交方法的建立,为我国的支原体感染诊断提供了又一新分子生物学检测手段,尤其是 MH、UU 感染分子生物学诊断方法目前国内尚缺。

参 考 文 献

- 1 Marmur J. A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. *J Mol Biol*, 1961, 3(2): 208
- 2 Robertson JA, Pyle LE, Stemke GW, et al. Human ureaplasma show diverse genome sizes by pulsed-field electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(6): 1451
- 3 杨 进. 支原体、军团病菌的 DNA 探针快速诊断. *微生物与免疫学进展*, 1990, 18(2): 66
- 4 郭慕华,鲁润铭,陈庆学,等. 肺炎支原体 DNA 提取和纯化的研究. *中国医科大学学报*, 1987, 16(2): 97
- 5 Chetrit P, Gaudin V, Courcel AD, et al. A croS-hybridization method for DNA mapping with photobiotin-labeled probes. *Anal Biochem*, 1989, 178(2): 273
- 6 Yogev D, Razin S. Common DNA sequences in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae* genomes. *Int J Syst Bacteriol*, 1986, 36(3): 42
- 7 Kleemola SRM, Karjalainen JE, Raty RKH. Rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection clinical evaluation of a commercial probe test. *J Infect Dis*, 1990, 162(1): 70
- 8 Hata D, Kuze F, Mochizuki Y, et al. Evaluation of DNA probe test for rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J Pediatr*, 1990, 116(2): 273

(1994-11-15 收稿 1995-06-16 修回)

ESTABLISHMENT ABOUT THE HYBRIDIZATION METHOD OF PHOTOBIO TIN-LABELED MYCOPLASMAL TOTAL DNA PROBES

Lai Xiaomin Fang Guoyuan Wang Chuan'en Li Caixia

(Department of Microbiology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

The authors prepared photobiotin-labeled total DNA probes from standard strains of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* serotypes 1,4 and 8 since their genome sizes are smaller than bacteria. The probes could detect homologous *Mycoplasmas* by dot hybridization. But the *Ureaplasma urealyticum* probes of 3 serotypes could not be used to identify serotypes of *Ureaplasma urealyticum*. In detection, the sensitivity of the probes is lower than general DNA fragment probes, the reason for which may be that the former has the greater molecular weight and therefore reduces the rate and efficiency of hybridization. Mycoplasma total DNA extracted to label photobiotin can simplify the method of probe preparation. The probes have no radioactive damage and decay, may be preserved easily and provided to laboratories and hospitals.

Subject headings Mycoplasma; DNA probes; nucleic acid hybridization/methods

· 简 讯 ·

关永源获求是科技基金杰出青年学者奖

金秋是收获的季节,中山医科大学药理教研室关永源教授光荣出席了9月16日在北京举行的由国务委员、国家科委主任宋健颁奖的香港求是科学基金会“杰出科学家奖”、“杰出青年学者奖”和“杰出科技成就集体奖”颁奖仪式。香港求是科技基金会成立于1994年初,目的是奖励为我国科技和教育事业发展作出突出贡献的人才。在表彰为中国的科技事业作出杰出贡献的老一辈科学家的同时,1995年求是科技基金会还设立了“杰出青年学者奖”,授予20位分别在数学、物理、化学及生物医学各领域崭露头角的青年学者各5位,他们中年龄最大50岁,最小30岁。广东省获此项奖励的有两人,中山大学周建英获物理学奖,关永源获生物医学奖,奖金1万美元,连续4年,作为资助本人及其课题组生活补贴。关永源从1978年以来,一直从事 α 肾上腺素受体 Ca^{2+} 调控功能,受体操纵 Ca^{2+} 通道特性及三七皂苷对其作用的研究。已在国内外杂志发表45篇论文,被100余名国外学者引用,部分研究工作已得到国外学者重复证实,并成功地分离出特异性阻断受体操纵 Ca^{2+} 通道的三七皂苷有效单体。近几年分别获得国家教委科技进步二等奖、一等奖;广东省第三届“丁颖科技奖”。1990年被评为“广东省先进中医药科技工作者”,1991年被评为“广东省高校七、五期间先进科技工作者”。1990年以来研究工作分别获国家自然科学基金、国家教委博士点基金、卫生部科学基金、省自然科学基金及广东省中医药科技基金等资助。“杰出青年学者奖”正是关永源教授为医学科技事业发展孜孜不倦着意追求的结果。

(冯世容)